

**Modifizierte Nukleoside
in Ribonukleinsäuren
grampositiver Bakterien**

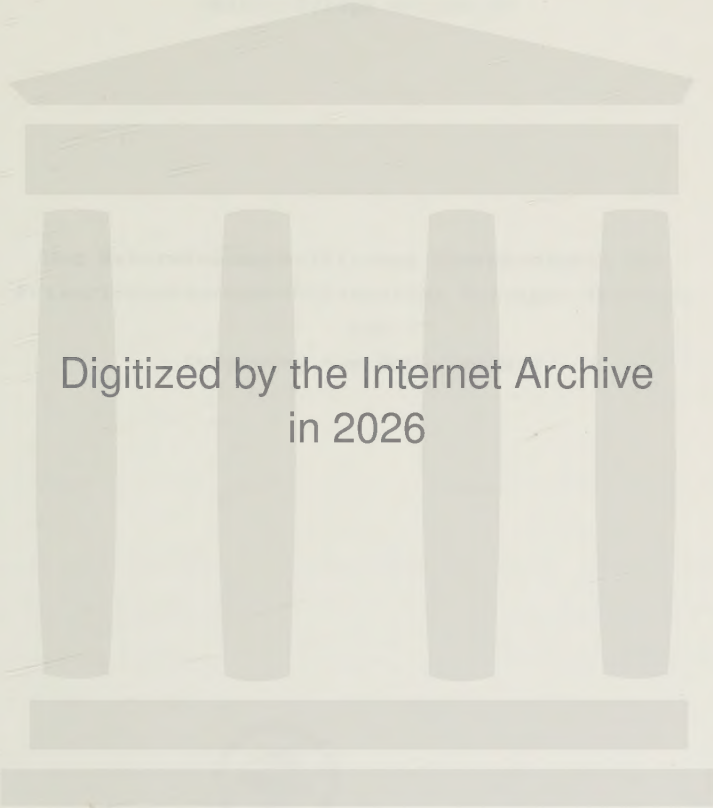
Vorgelegt

von

Walter Schmidt

aus

Schwarzenbach/Wald



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548420_0073

MODIFIZIERTE NUKLEOSIDE IN RIBONUKLEINSÄUREN

GRAMPOSITIVER BAKTERIEN

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades



vorgelegt

von

Walter Schmidt

aus

Schwarzenbach/Wald

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen Fach-
bereichen der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung:

1. Februar 1977

Vorsitzender der Promotionskommission: Professor Dr. E. Schweizer

Erstberichterstatter:

Professor Dr. H. Kersten

Zweitberichterstatter:

Professor Dr. W. Heumann



Meinen Eltern und meiner Frau gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde bei Frau Prof. Dr. H. Kersten
- Arbeitsgruppe Biochemie -
Fachbereich Chemie/Biologie
an der Universität Erlangen - Nürnberg durchgeführt

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	4
2.1. Material	4
2.2. Bakterienstämme und Medien	6
2.3. Wachstumsbedingungen	8
2.4. Behandlung der Zellen mit Trimethoprim	9
2.5. Einbau radioaktiver Vorstufen	9
2.6. Isolierung von Gesamt-tRNA	9
2.7. Isolierung von ribosomaler RNA	11
2.8. Präparation von Enzymextrakten und 70S Ribosomen	13
2.9. In vitro Methylierung von tRNA und rRNA	14
2.10 Hydrolyse der Ribonukleinsäuren	15
2.11 Trennung von RNA-Bausteinen	18
2.12 Nukleosidanalyse von RNA durch nachträgliche ³ H-Markierung	19
3. ERGEBNISSE	
3.1. Modifikation der tRNA von E. coli, B. subtilis und M. lysodeikticus	25
3.1.1. Methylierte Basen von B. subtilis tRNA	25
3.1.2. Nukleosidanalyse der tRNA von E. coli, B. subtilis und M. lysodeikticus	27
3.2. Biosynthese von Ribothymidin in tRNAs grampositi- ver Bakterien	32
3.2.1. Hemmung der Biosynthese von Ribothymidin tRNA grampositiver Bakterien durch Tri- methoprim	32
3.2.2. Wachstum der Bakterien unter dem Einfluß von Trimethoprim	35
3.2.3. Methylierung der tRNAs in vitro	39
3.2.4. Markierung von Ribothymidin durch Einbau von ¹⁴ C-Formiat	48

3.3. Methylierte Basen und Biosynthese von Ribothymidin in rRNA von <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> und <i>M. lyso-deikticus</i>	49
3.3.1. Methylgruppengehalt der rRNA	49
3.3.2. Methylierte Basen der 16S rRNA	52
3.3.3. Methylierte Basen der 23S rRNA	55
3.3.4. Weitere Modifikationen der rRNA von <i>B. subtilis</i>	57
3.3.5. In vitro Methylierung der rRNA von <i>B. subtilis</i> mit <i>E. coli</i> Enzym	58
3.4. Charakterisierung der Base P in tRNA von <i>B. subtilis</i>	64
3.5. Vorkommen von ms ^{2,6} A in <i>B. subtilis</i> tRNA	75
3.6. Nukleosidanalyse spezifischer tRNAs aus <i>B. subtilis</i>	77
4. DISKUSSION	
4.1. Biosynthese von Ribothymidin in grampositiven und gramnegativen Bakterien	80
4.2. Modifizierte Nukleoside der rRNA von <i>B. subtilis</i>	86
4.3. Spezielle Nukleoside der tRNA grampositiver Bakterien	90
4.4. Modifizierung von tRNA und Differenzierung	92
5. ZUSAMMENFASSUNG	94
LITERATURVERZEICHNIS	96
ANHANG	103

Verwendete Abkürzungen

A = Adenosin, G = Guanosin, C = Cytidin, U = Uridin;
 m^1A = 1-Methyladenosin, m^2A = 2-Methyladenosin, m^6A = 6-Methyladenosin, m_2^6A = Dimethyladenosin, ms^2i^6A = 2-Thiomethyl-6-isopentenyladenosin, m^1G = 1-Methylguanosin, m^2G = 2-Methylguanosin, m_2^2G = 2-Dimethylguanosin, m^7G = 7-Methylguanosin, m^5C = 5-Methylcytidin, m^3U = 3-Methyluridin, m^5U = Ribothymidin,
 Ψ = Pseudouridin, hU = Dihydrouridin, s^4U = 4-Thiouridin,
P = 5-Metoxuridin, Q = 7-(4,5-cis-dihydroxy-1-cyclopenten-3yl-aminomethyl)deazaguanosin;
Np = 3'-Mononukleotid, Nm = ribose-methyliertes Nukleosid,
N' = Nukleosidtrialkohol;

Bicin = N,N-bis(2-hydroxymethyl)glycin, Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan, SDS = Natriumdodecylsulfat, EDTA = Äthylen-diamintetraessigsäure, DEAE-Cellulose = Diäthylaminoäthyl-Cellulose, BD-Cellulose = benzoyleierte DEAE-Cellulose, TCA = Trichlor-essigsäure;

$tRNA^{Met}_f$ = methionin-spezifische tRNA (formylierbar)

$tRNA^{Phe}$ = phenylalanin-spezifische tRNA

$tRNA^{Tyr}$ = tyrosin-spezifische tRNA

RPC-Chromatografie = Reverse Phase Chromatography

SAM = S-Adenosylmethionin THF = Tetrahydrofolsäure

1. EINLEITUNG

Lange Zeit wurde angenommen, daß Nukleinsäuren Polymere sind, die aus vier Basen aufgebaut werden: die Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus Desoxyadenosin, Desoxyguanosin, Desoxycytidin und Desoxythymidin, die Ribonukleinsäure (RNA) aus Adenosin, Guanosin, Cytidin und Uridin. In den fünfziger Jahren wurde jedoch gefunden, daß Nukleinsäuren Verbindungen enthalten, die sich von den vier Hauptnukleosiden unterscheiden (Wyatt 1951, Littlefield und Dunn 1958, Smith und Dunn 1959). Diese Entdeckungen führten zu einer Reihe von Untersuchungen, die sich mit dem Vorkommen und der Synthese seltener Nukleoside befaßten. Bis heute sind über fünfzig "modifizierte" Nukleoside bekannt. Sie kommen in DNA, Transfer RNA (tRNA) und ribosomaler RNA (rRNA) vieler Organismen vor (Hall 1971, Nishimura 1972). Vor kurzem wurden modifizierte Nukleoside auch in Messenger RNA (mRNA) und viraler RNA entdeckt (Perry und Kelley 1974, Furuichi et al. 1975, Zimmern 1975, Marcu und Dudock 1975).

Einen großen Anteil der modifizierten Nukleoside machen die methylierten Nukleoside aus. Sie unterscheiden sich von den Hauptnukleosiden durch ein oder zwei Methylgruppen, die sowohl am heterozyklischen Ringsystem der Purine und Pyrimidine als auch am 2'-Hydroxyl der Ribose eingeführt werden können. Die Synthese dieser methylierten Nukleoside erfolgt post-transkriptional, d.h. auf der Stufe der Polynukleotide durch spezifische Methyltransferasen (Fleissner und Borek 1962, Srinivasan und Borek 1963). Als Methyl donor dieser Transmethylierungen dient S-Adenosylmethionin (Fleissner und Borek 1963), das aus Methionin und Adenosintriphosphat synthetisiert wird.

In der Arbeitsgruppe Kersten wurde beobachtet, daß die Methylierung von tRNA in *Bacillus subtilis* unter dem Einfluß von Inhibitoren der Proteinbiosynthese unvollständig ist (Kersten et al. 1968, Kersten und Linkemann 1969, Schmidt 1973). Die methylierten Basen der tRNA von *B. subtilis* wurden deshalb

genauer analysiert (Arnold und Kersten 1973, Domdey 1974). Im Muster der methylierten Basen der tRNAs von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* traten charakteristische Unterschiede auf:

- (i) In tRNA von *B. subtilis* findet sich kein radioaktiv markiertes Ribothymidin (m^5U), wenn die Bakterien in einem Medium gezüchtet werden, das $^{14}CH_3$ -Methionin enthält. In *E. coli* tRNA macht Ribothymidin fast fünfzig Prozent der methylierten Basen aus.
- (ii) *B. subtilis* tRNA enthält 1-Methyladenin, eine methylierte Base, die für tRNAs von Eukaryoten charakteristisch ist.
- (iii) In tRNA von *B. subtilis* kommt ein unbekanntes methyliertes Nukleosidderivat vor; es wurde mit dem Buchstaben "P" bezeichnet.

Durch nachträgliche 3H -Markierung der Nukleoside der tRNA von *B. subtilis* konnte gezeigt werden, daß Ribothymidin vorkommt und alle tRNA-Spezies einen m^5U -Rest enthalten (Randerath et al. 1974). Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob der von uns verwendete Stamm *B. subtilis* W 23 mutiert war und die tRNA kein Ribothymidin enthielt (wie z.B. m^5U^- -Mutanten von *E. coli*, siehe Björk und Isaksson 1970) oder ob die Methylgruppe von einem anderen Donor als S-Adenosylmethionin (SAM) bereitgestellt wird. Die Beantwortung dieser Frage ist möglich, wenn die tRNA aus *B. subtilis* W 23 mit der von Randerath et al. (1972) beschriebenen Methode analysiert wird.

Im Verlauf der Arbeit zeigte sich, daß Ribothymidin in der tRNA von *B. subtilis* W 23 über ein Tetrahydrofolsäurederivat als Methylgruppendonator synthetisiert wird (Arnold, Schmidt und Kersten 1975, Arnold und Kersten 1975, Kersten et al. 1975). Daher wurde weiter geprüft, ob der SAM-unabhängige Biosyntheseweg von m^5U nur auf *B. subtilis* beschränkt ist oder auch in anderen Familien der *Bacteriaceae* eine Rolle spielt.

Aus Untersuchungen über die Modifikation von rRNA aus *E. coli* ist bekannt, daß m^5U in der 23S rRNA vorkommt und über SAM synthetisiert wird (Dubin und Günalp 1967, Fellner 1969). Eine Analyse der methylierten Basen von *B. subtilis* rRNA wurde im Hinblick auf die Biosynthese von Ribothymidin in ribosomaler RNA von *B. subtilis* im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Ein weiteres Charakteristikum der tRNA von *B. subtilis* ist die modifizierte Base "P", die in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Zellen vorkommt. Es sollte geklärt werden, ob P ein methyliertes Purin- oder Pyrimidinderivat ist oder ob P durch chemische Veränderung einer bekannten Base bei der Aufarbeitung entsteht. Auch in tRNA von *Bacillus stearothermophilus* wurde ein unbekanntes Pyrimidinderivat nachgewiesen (Agris et al. 1973), das mit P auf Grund des ähnlichen chromatografischen Laufverhaltens identisch sein könnte.

In einer Reihe von spezifischen tRNAs aus Prokaryoten wurde in Nachbarstellung zum Anticodon der tRNA die hypermodifizierte Base 2-Thiomethyl-N⁶-isopentenyladenin (ms^2i^6A) gefunden. Dieses Nukleosid ist von besonderem Interesse, da es anscheinend nur in reifer tRNA vorkommt und in Vorläufern durch i^6A bzw. Adenosin ersetzt ist (Huang und Mann 1974). Es sollte daher untersucht werden, ob und in welchen tRNAs von *B. subtilis* ms^2i^6A vorkommt. In der tRNA von *E. coli* und *B. subtilis* wurde eine Base "X" gefunden (Arnold, Dissertation 1973), die ms^2i^6A ähnlich war, jedoch auf Grund des chromatografischen Laufverhaltens mit diesem nicht identisch sein konnte.

Eine weitere Besonderheit der tRNA von *B. subtilis* ist das Vorkommen von 1-Methyladenosin. In unserem Arbeitskreis wurden mehrere spezifische tRNAs isoliert. Diese tRNAs sollten auf den Gehalt an m^1A und anderer modifizierter Nukleoside untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Alle gängigen Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt, bezogen. Die für die Chromatografien benötigten Chemikalien wurden von folgenden Firmen geliefert: Resines Voltalef 300 LD-PL micro von Ugine Kuhlmann, Frankreich, über Lehmann und Voss, Hamburg; Adogen 464 von Ashland Chemical Co., Columbus, USA, über Biesterfeld und Co., Hamburg; Cellulose Dünnschichtplatten ohne Fluoreszenzindikator (20 x 20 cm) von Merck; Cellulose Plastikfolien von Merck, Darmstadt und Machery & Nagel, Düren; DEAE-Cellulose DE 32 von Whatman, England, über Serva, Heidelberg; Whatman Nr.1 und Whatman 3MM Chromatografiepapier von Hormuth & Vetter, Bad Wiesloch; Transfer RNA aus E. coli MRE 600 von Boehringer, Mannheim; RNase A (= pankreatische RNase) von Boehringer, Mannheim; Schlangengiftdiesterase, alkalische Phosphatase und DNase I von Worthington, Freehold, USA, über Roth, Karlsruhe; RNase T₂ von Calbiochem, San Diego, USA, über Päsel, Frankfurt; methylierte Nukleoside von Cyclo-Chemical Corp., Los Angeles, USA; Röntgenfilme Osray T₄ (Agfa) und RP X-Omat (Kodak) von Lacher, Erlangen.

Trimethoprim war ein Geschenk von Hoffmann-La Roche, Grenzach, Schweiz.

2.1.2. Radioaktive Substanzen

Alle radioaktiven Substanzen wurden von Radiochemical Centre, Amersham, über Zweigniederlassung Frankfurt/Main, bezogen und in folgenden spezifischen Aktivitäten geliefert:

(^{14}C -methyl) S-Adenosylmethionin 55 mCi/mmol

Für analytische Methylierungen wurde ^{14}C -SAM mit nicht markiertem SAM in 0,001 N Schwefelsäure verdünnt. Die spezifische Radioaktivität betrug dann 10,2 mCi/mmol.

(U- ^{14}C) Adenin 108 mCi/mmol

(2- ^{14}C) Uridin 54 mCi/mmol

(^{14}C -methyl) Methionin 56 mCi/mmol

^{35}S -Natriumsulfat 46 mCi/mmol

^3H -Kaliumborhydrid 5-18 Ci/mmol

2.1.3. Chromatografiezubehör

Die Säulenchromatografien wurden in Glassäulen durchgeführt. Mit Perpex-Pumpen (LKB, Bromma, Schweden) wurden konstante Durchflußraten erreicht. Das Eluat wurde mit einem Uvicord I oder II bei 254 nm gemessen. Die Signale wurden auf einem Zweikanalschreiber registriert. Die Leitfähigkeit des Eluats wurde mit einem Conductolyzer (LKB) gemessen. Die Fraktionen wurden in einem Ultrorac-Fraktionssammler (LKB) gesammelt, der in einer Kühltruhe (Colora, Lorch) aufgestellt war.

2.1.4. Spektralphotometer

Die optische Dichte von Bakteriensuspensionen wurde in einem Spektrallinienphotometer (Eppendorf) mit Streulichtaufsatz bei 578 nm gemessen. Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurden in Zeiß-Photometern, Typ PMQ II oder PMQ III bei 260 nm bestimmt ^{a)}. Kontinuierliche Spektren wurden an einem Beckman-Gerät, Modell 25, aufgenommen.

a) $1 \text{ OD} = 1 A_{260}$ entspricht der Menge an Nukleinsäuren, die in 1 ml H_2O gelöst bei 260 nm die Extinktion 1,0 ergibt (Schichtdicke: 1 cm)

2.1.5. Zentrifugen

Für niedertourige Zentrifugationen wurden Sorvall, Mistral L6, MSE 18 und MSE 25 verwendet, für Gradientenzentrifugationen und Schwerefeldbereich größer als 35.000 x g die Ultrazentrifuge MSE 65.

2.1.6. Szintillatoren

Die Radioaktivität der Proben wurde in Tricarb-Flüssigkeits-szintillationszählern der Firma Packard (Modelle 574, 3320 und 3385) bestimmt. Die Szintillatoren PPO und Dimethyl-POPOP wurden von Zinser, Frankfurt, bezogen.

Toluolszintillator: 5 g PPO, 0,3 g Dimethyl-POPOP in 1 Liter Toluol

Dioxanszintillator: 60 g Naphthalin, 20 ml Äthylenglykol, 100 ml Methanol, 4 g PPO, 0,2 g POPOP ad 1 Liter Dioxan

2.2. Bakterienstämme und Medien

Die Bakterienstämme *Rhizobium lupini* 16-1, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Bacillus circulans* und *Xanthomonas pruni* wurden uns dankenswerterweise von Herrn Prof. Heumann und Herrn Dr. Rösch, Institut für Mikrobiologie, Erlangen, zur Verfügung gestellt. *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698) und *Streptococcus faecium* wurden von Herrn Prof. Fischer, Institut für Physiologische Chemie, Erlangen, *Bacillus stearothermophilus* von Herrn Prof. Schweiger, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin und *Escherichia coli* IB 5 von Herrn Prof. Björk, Umea, Schweden, überlassen.

B. subtilis W 23, B. subtilis met⁻ind⁻, E. coli MRE 600, E. coli met⁻rel⁻, B. megaterium und M. lysodeikticus^{a)} standen aus der Sammlung des Instituts für Physiologische Chemie zur Verfügung. Alle übrigen Stämme wurden über die "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen", München, bezogen.

a) Dieser nicht näher charakterisierte Stamm stammte aus dem Labor von Prof. Szybalsky, Madison, USA. Die Nukleosidanalyse der tRNA dieses Stammes wies keine signifikanten Unterschiede zur Nukleosidanalyse der tRNA des ATCC-Stammes auf. Die in vivo Markierung der rRNA mit radioaktivem Methionin wurden mit diesem Stamm aus Madison durchgeführt, da dieser Keim im Gegensatz zu M. lysodeikticus ATCC 4698 in einem Minimalmedium gezüchtet werden konnte. Im folgenden wird dieser Stamm als M. lysodeikticus* bezeichnet.

B. subtilis W 23, B. subtilis ind⁻met⁻, B. circulans, B. megaterium, B. coagulans, B. brevis, B. licheniformis, M. lysodeikticus*, E. coli MRE 600, P. aeruginosa, S. marcescens, S. typhimurium und X. pruni wurden in Medium B (Nakada 1965) gezüchtet.

Medium B: 6 g KH₂PO₄, 11,5 g Na₂HPO₄, 0,2 g MgSO₄ x 7 H₂O,
2 g (NH₄)₂SO₄, 2,54 g Na-Glutaminat, 0,33 mg
MnSO₄ x H₂O, 4 g Glucose, A. bidest ad 1 Liter,
pH = 7

A. albidus, C. bovis, M. lysodeikticus, M. varians, S. aureus und S. faecium wurden in Medium A gezüchtet.

Medium A: 10 g Pepton (Difco), 5 g Hefeextrakt (Difco), 5 g Glucose, 5 g NaCl, A. bidest. ad 1 Liter, pH = 7,4

B. pumilis, B. stearothermophilus (bei 60°C), E. coli MRE 600 und E. coli IB 5 wurden in Medium C gezüchtet.

Medium C: 5 g Pepton, 5 g Fleischextrakt (Oxoid), 5 g NaCl, A. bidest. ad 1 Liter, pH = 7

Zur Gewinnung m⁵U-defizienter tRNA wurde E. coli IB 5 in Medium D (Björk und Isaksson 1970) gezüchtet.

Medium D: 10 g K₂HPO₄, 3,5 g Na(NH₄)HPO₄ x 4 H₂O, 2 g Citronensäure, 0,2 g MgSO₄ x 7 H₂O, 7 g Glucose, 1 mg

Thiamin, je 0,1 g L-Threonin, L-Leucin, L-Histidin, L-Arginin, A. bidest. ad 1 Liter, pH = 7

R. lupini wurde in Medium E gezüchtet.

Medium E: 8 g Nutrient Broth (Difco), A. bidest ad 1 Liter, pH = 7

E. coli met⁻rel⁻ wurde in Medium F (Hurwitz et al. 1964) gezüchtet.

Medium F: 3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 1 g NH_4Cl , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,5 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 5,5 mg CaCl_2 , 50 mg L-Methionin, 5 g Glucose, A. bidest. ad 1 Liter, pH = 7

Wenn die Konzentration an L-Methionin auf 2,5 mg/l erniedrigt wird, kann untermethylierte tRNA aus den Keimen isoliert werden

B. subtilis ind⁻met⁻ wurde in Medium B mit 10 mg/l L-Methionin und 25 mg/l Indol gezüchtet.

2.3. Wachstumsbedingungen

Zur Gewinnung von tRNA und rRNA wurden die Bakterien in der Regel in einem Minimalmedium (Medium B, D oder F) gezüchtet. Ribosomen und Enzymextrakte wurden aus Keimen gewonnen, die in einem Maximalmedium kultiviert wurden.

Übernachtskulturen wurden 1:100 mit frischem Medium verdünnt und bei 37°C auf einer Schüttelapparatur gezüchtet. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm verfolgt. Die Bakterienkulturen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase (für Präparation von Enzymextrakten) oder in der stationären Phase (für Isolierung von Ribonukleinsäuren) geerntet. Nach Zentrifugation wurden die Bakterien bei -20°C eingefroren.

2.4. Behandlung der Zellkulturen mit Trimethoprim

Den Zellen wurde Trimethoprim in verschiedenen Konzentrationen von 5-100 µg/ml bei einer optischen Dichte von $A_{578} = 0,2$ zugesetzt. Das Wachstum der Bakterien wurde weiterhin durch Messung der optischen Dichte verfolgt. Nach 30 min wurden Adenosin, Guanosin, Desoxythymidin (je 100 µg/ml) sowie Glycin und Methionin (je 20 µg/ml) zugegeben und das Wachstum bis zu einer optischen Dichte von 1,2 verfolgt.

Die tRNA wurde aus 500 ml Trimethoprim behandelten Bakterien-suspensionen gewonnen. Es wurde diejenige Konzentration an Trimethoprim gewählt, bei der das Wachstum der Bakterien am stärksten gehemmt wurde.

2.5. Einbau radioaktiver Vorstufen

Als radioaktiv markierte Vorstufen wurden (^{14}C -methyl) Methionin (100 µCi/7 µmol bei *B. subtilis* W 23, *B. subtilis* met⁻ind⁻ und *M. lysodeikticus*^{*}, 100 µCi/33 µmol bei *E. coli* met⁻rel⁻), ^{14}C -Uridin (20 µCi/2 µmol), ^{14}C -Adenin (20 µCi/2 µmol), ^{14}C -Natriumformiat (500 µCi/8,5 µmol) und ^{35}S -Natriumsulfat (1 mCi/22 µmol) kurz nach Inoculation den wachsenden Kulturen (jeweils 100 ml) zugesetzt. Die Zellen wurden in der stationären Phase geerntet. Etwa 80-90% der gesamten Radioaktivität wurden von den Zellen aufgenommen.

2.6. Isolierung von Gesamt-tRNA

Unterschiedliche Präparationsmethoden für tRNA wurden angewandt, um sowohl aus kleinen Bakterienmengen (0,1 - 2 g) als auch aus größeren Mengen (10 - 50 g) biologisch aktive tRNA zu isolieren, die weitgehend frei von niedermolekularen und hochmolekularen Verunreinigungen sein sollte.

2.6.1. Präparation von Gesamt-tRNA aus kleinen Mengen Bakterien

Die Bakterien wurden mit der dreifachen Menge Aluminiumoxid (Alcoa) einige Minuten bei 4°C zerrieben. Die pastenartige Masse wurde in 1-2 ml Nirenberg-DNase-Puffer (0,01 M Tris, 0,01 M Mg-Acetat, 0,006 M β -Mercaptoäthanol, 0,06 M KCl, 150 Aktivitätseinheiten/ml DNase I, pH = 7,6) aufgenommen und 10 min. bei 10.000 x g zentrifugiert. Die Proteine wurden mit 3 Vol 80%igem Phenol denaturiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde noch ein- bis zweimal mit Phenol behandelt bis kein Proteinniederschlag mehr sichtbar war. Die wässrige Phase wurde auf eine 1 x 3 cm DEAE-Cellulose-Säule (Yang und Novelli 1968) gegeben, die zuvor mit Puffer A (0,25 M NaCl, 0,01 M Mg-Acetat, 1 mM EDTA, pH = 4,8) äquilibriert worden war. Niedermolekulare Bestandteile und Phenol wurden mit ca. 50 ml Puffer A ausgewaschen. Die tRNA wird anschließend mit Puffer B (wie Puffer A, jedoch 0,5 M NaCl) eluiert, am Rotationsverdampfer eingengt, in H_2O aufgenommen und mindestens 2 x 2 Std. gegen A. bidest. dialysiert. Nach der Dialyse wurde die tRNA mit 2 Vol kaltem Äthanol (-20°C) gefällt. Die nach Zentrifugation in H_2O gelöste Probe wurde dann bei -20°C eingefroren.

2.6.2. Präparation von Gesamt-tRNA aus großen Mengen Bakterien

Bei diesem Verfahren wurde der Chromatogrphieschritt an DEAE-Cellulose umgangen. Die Nukleinsäuren wurden mit Phenol/SDS (Doi 1971) extrahiert und mit Äthanol gefällt. Die Abtrennung der ribosomalen RNA erfolgte durch Fällung mit 2 M LiCl (Avital und Elson 1969). Die DNA wurde anschließend durch fraktionierte Fällung mit Isopropanol (Zubay 1962) abgetrennt.

2.7. Isolierung von ribosomaler RNA

Für die Präparation von ribosomaler RNA wurden je nach Fragestellung zwei verschiedene Methoden angewandt. Radioaktiv markierte rRNAs (kleine Mengen) wurden über eine RPC-5-Säule (Egan und Kelmers 1972) isoliert. Größere Mengen nicht markierter rRNA wurden aus 70S Ribosomen gewonnen (Traub et al. 1971).

2.7.1. Trennung der rRNAs durch RPC-5-Chromatografie

Der Nukleinsäureextrakt wurde wie in 2.6.1. beschrieben hergestellt. Eine gute Trennung von 16S rRNA und 23S rRNA wurde nur dann erreicht, wenn die Mg^{2+} -Konzentration vor der Phenolisierung auf $2,5 \times 10^{-3}$ M erniedrigt wurde.

Die Beschichtung des Trägers (Voltalef) mit der stationären Phase (Adogen 464) wurde nach Literaturvorschrift (Pearson et al. 1971) durchgeführt. Die Säule (34 cm lang, 0,9 cm Durchmesser) wurde unter geringem Überdruck (Perpex Pumpe) mit dem beschichteten Trägermaterial gefüllt und mit Puffer D (0,4 M NaCl, 0,05 M Tris, 0,01 M Mg-Acetat, pH = 7,3) äquilibriert. Die Durchflußrate von ca. 80 ml/Std. konnte mit dem Perpex-Getriebe 2:25 erzielt werden. Maximal 20 OD des Nukleinsäureextraktes konnten auf diese Säule aufgetragen werden.

Die Ribonukleinsäuren werden in erster Linie auf Grund ihrer unterschiedlichen negativen Ladung unterschiedlich fest am Austauschermaterial gebunden und werden mit einem steigenden Kochsalzgradienten als mobile Phase (0,4 M NaCl bis 1,5 M NaCl) in der Reihenfolge tRNA + 5S rRNA, 16S rRNA und 23S rRNA von der Säule eluiert. Der Gradient wurde erreicht, indem 75 ml Puffer D und 75 ml Puffer E (wie Puffer D, jedoch 1,5 M NaCl) in zwei Glaszylinder gefüllt wurden, die über ein Schlauchsystem miteinander verbunden wurden. Das Eluat wurde in Fraktionen von ca. 2,5 ml gesammelt und die Radioaktivität (0,5 ml in 10 ml Dioxan) sowie die Absorption (bei 260 nm) jeder Frak-

tion bestimmt. Die zur weiteren Aufarbeitung bestimmten Fraktionen von 16S rRNA und 23S rRNA wurden vereint und zweimal mehrere Std. gegen A. bidest. dialysiert. Am Rotationsverdampfer wurde anschließend auf ein kleines Volumen eingengt und die rRNAs mit Äthanol (-20°C) gefällt.

Die auf diese Weise isolierte rRNA zeigte jedoch in der analytischen Polyacrylamid-Gelelektrophorese die gleiche elektrophoretische Mobilität wie 4S RNA (Die Elektrophorese wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Böcker durchgeführt). Da die überprüften rRNA-Fraktionen ausschließlich als 4S RNA-Bruchstücke vorlagen, mußte angenommen werden, daß sowohl die 16S rRNA als auch die 23S rRNA im Zuge der Aufarbeitung (Dialyse, Einengen) zu Bruchstücken abgebaut wurden. Diese Methode der rRNA-Isolierung wurde nur dann angewandt, wenn radioaktiv markierte rRNA zur Analyse der methylierten Basen anschließend hydrolysiert wurde. Wenn es auf die Isolierung biologisch intakter rRNA (z.B. für nachfolgende Methylierung *in vitro*) ankam, wurde die aufwendigere Methode der Isolierung durch Gradientenzentrifugation gewählt.

2.7.2. Isolierung von 16S rRNA und 23S RNA durch Gradientenzentrifugation

Die Isolierung von 70S Ribosomen wird ausführlich unter 2.8. beschrieben. Die Gradientenzentrifugation ist in allen Einzelheiten bei Loh (Dissertation 1973) angegeben.

Zur Dissoziation von 70S Ribosomen in 30S und 50S Untereinheiten wurde gegen DP-Puffer (10 mM Tris, 60 mM KCl, 6 mM β -Mercaptoäthanol, 30 mM NH_4Cl , 0,3 mM MgCl_2 , pH = 7,8) zweimal dialysiert. Ca. 0,5 ml dissoziierte Ribosomen (5-50 OD) wurden auf einen 9-45%igen Saacharosegradienten (in DP-Puffer) aufgetragen. Die Ribosomenuntereinheiten wurden 14 Std. bei $129.000 \times g$ im 3×23 ml Ausschwingrotor in der Ultrazentrifuge (MSE 65) zentrifugiert. Der Gradient wurde vom Boden des Zentrifugenröhrchens aus in eine Durchflußküvette gepumpt und

in Fraktionen von 1 ml aufgefangen. Die Absorption bei 260 nm (bei einem Auftrag von 5 OD Ribosomen) bzw. die Absorption bei 290 nm (bei einem Auftrag von 50 OD Ribosomen) wurde mit einem Schreiber, der mit einem Spektralphotometer (Zeiß PMQ II) verbunden ist, registriert. Die Fraktionen, die 50S und 30S ribosomale Untereinheiten enthalten, wurden getrennt gesammelt. Die Sedimentation der ribosomalen Untereinheiten wurde durch Zentrifugation in der Ultrazentrifuge erreicht (10 x 10 ml Festwinkelrotor, 14 Std. bei 45.000 Upm).

Die 16S rRNA und die 23S rRNA wurden aus den entsprechenden 30S und 50S ribosomalen Untereinheiten isoliert. Hierzu wurden die Sedimente in 1 ml DP-Puffer gelöst und mit dem gleichen Volumen Citratpuffer (0,15 M NaCl, 15 mM Na-Citrat, 10 mM EDTA, pH = 7,0), 0,2 Vol 10%igem SDS und 0,4 Vol 2%iger Bentonitlösung (hemmt RNasen) versetzt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit dem gleichen Volumen 80%igem Phenol versetzt und ca. 30 min gerührt. Die wässrige Phase wurde nach Zentrifugation vorsichtig abgehoben und die Phenolbehandlung wiederholt. Die ribosomalen RNAs wurden dann aus der wässrigen Phase mit kaltem Äthanol ausgefällt.

2.8. Präparation von Enzymextrakten und 70S Ribosomen

Die Bakterien wurden mit der dreifachen Menge Alcoa im Mörser aufgeschlossen und in der doppelten Menge Nirenberg-DNase-Puffer aufgenommen (siehe 2.6.1.). Alcoa und Zelltrümmer wurden niedertourig abzentrifugiert. Der so erhaltene Überstand (S-10) wurde 1 Std. im 8 x 50 ml Rotor der MSE 18 Zentrifuge bei 30.000 x g zentrifugiert. Der S-30 Überstand wurde dann 2 Std. im 8 x 25 ml Rotor oder im 10 x 10 ml Rotor in der MSE 65 Ultrazentrifuge bei 100.000 x g zentrifugiert. Die oberen zwei Drittel des Überstandes (S-100) wurden in kleinen Portionen bei -70°C oder -35°C eingefroren. Der Proteingehalt des Enzymextraktes wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt.

Die weitere Reinigung der sedimentierten Ribosomen erfolgt über Saccharose. Der Niederschlag wurde in ca. 10 ml S1-Puffer (10 mM Tris, 60 mM KCl, 6mM Mercaptoäthanol, 10mM Mg-Acetat, pH = 7,8) vorsichtig mit einem Glaspistill gelöst und vorsichtig auf 10 ml Saccharose-Puffer (1,1 M Saccharose, 0,5 M NH_4Cl , 10 mM Mg-Acetat, 20 mM Tris, 0,5 mM EDTA, pH = 7,8) im Zentrifugenröhrchen geschichtet. Die Ribosomen wurden 14 Std. bei 100.000 x g zentrifugiert, der Niederschlag in S1-Puffer gelöst und die gelösten 70S Ribosomen in kleinen Portionen bei -70°C eingefroren. Der Proteingehalt der Ribosomen kann nach Lowry et al. (1951), der RNA-Gehalt mit der Orcin-Methode nach Burton (1968) bestimmt werden.

2.9. In vitro Methylierung von tRNA und rRNA

Die enzymatische Übertragung von Methylgruppen auf tRNA und rRNA wurde modifiziert nach Kuchino et al. (1970) durchgeführt.

Zur Aufnahme einer Methylierungskinetik wurde folgender Standardansatz verwendet:

TMMG-Puffer (100 mM Triäthanolamin, 20 mM Mercaptoäthanol 10 mM MgCl_2 , pH = 8,0)	50 μl
RNA	1 OD
^{14}C -SAM (10,2 mCi/mmol)	19 nmol
S-100	180 μg
Tris-Puffer (50 mM, pH = 8,0)	ad 160 μl

Die Ansätze wurden bei 37°C inkubiert. Zu mehreren Zeitpunkten wurden den Ansätzen jeweils 50 μl entnommen, auf Whatman 3MM Papierfilter (Durchmesser 25 mm) pipettiert, kurz im heißen Luftstrom getrocknet und in kalte 10%ige Trichloressigsäure (TCA) gegeben (30 min). Die Filter wurden danach dreimal in kalter 5%iger TCA, einmal in Äther/Äthanol (1:1) und einmal in Äther gewaschen. Nach jedem Waschvorgang müssen die Plättchen

kurz auf Filterpapier getrocknet werden. Die Plättchen wurden in Gläschen mit 6 ml Toluolszintillator gegeben und die Radioaktivität gezählt. Die Filterplättchenmethode ist bei Mans und Novelli (1962) beschrieben.

Zur Basenanalyse bzw. Nukleotidanalyse müssen größere Mengen RNA methyliert werden. Es wurde außerdem eine höhere spezifische Radioaktivität des ^{14}C -SAM gewählt. Der Ansatz zur präparativen Methylierung ist wie folgt zusammengesetzt:

TMMG-Puffer, pH = 8,0	200 μl
RNA	4-5 OD
^{14}C -SAM (56 mCi/mmol)	91 nmol
S-100	800 μg
Tris-Puffer, pH = 8,0	ad 600 μl

Die Reaktion wurde nach 120 min (der Endpunkt der Reaktion wurde im analytischen Test bestimmt) durch Zugabe von 0,6 ml 80%igem Phenol gestoppt. Die methylierte RNA wurde über DEAE-Cellulose (Yang und Novelli 1968) zurückgewonnen. Die Elution von der Säule erfolgte mit Puffer C. (wie Puffer A, jedoch 1 M NaCl, siehe 2.6.1.)

2.10. Hydrolyse der Ribonukleinsäuren

Zur Spaltung von RNA in Basen bzw. Mononukleotide finden sowohl chemische Hydrolysen (mit Säuren und Basen) als auch enzymatische Verdauungen Anwendung. Die Spaltung mit Säuren und Basen führt bei einigen modifizierten Basen zu chemischen Veränderungen, ist aber nicht in jedem Fall durch enzymatische Hydrolysemethoden zu ersetzen (z.B. können freie Basen nur durch Säurehydrolyse erhalten werden).

2.10.1. Säurehydrolysen

Purin- und Pyrimidinbasen werden erhalten bei der Spaltung der RNA mit 72%iger Perchlorsäure bei 100⁰C (Kahle et al. 1971), 88%iger Ameisensäure bei 180⁰C (Munns et al. 1974) und conc. Trifluoressigsäure bei 180⁰C (Klagsbrun 1973). Ca. 5 OD RNA wurden mit 200 µl Säure in verschmolzenen Glasampullen (Prüfung, ob Ampulle wirklich dicht ist!) bei der entsprechenden Temperatur 2 Std. hydrolysiert. Wenn die Hydrolyse bei 180⁰C durchgeführt wurde, mußte die Glasampulle in eine Metallkapsel mit Verschluß überführt werden (hoher Druck!). Nach dem Abkühlen wurde die Glasampulle vorsichtig mit Hilfe einer Glasfeile geöffnet (unbedingt Schutzbrille tragen!)

Die Hydrolyse mit Perchlorsäure erfordert eine anschließende Entsalzung des Hydrolysats über Kohle (Lakings und Gehrke 1971, Arnold, Dissertation 1973). Ameisensäure kann dagegen am Rotationsverdampfer abgezogen werden. Routinemäßig wurde die Hydrolyse mit Perchlorsäure mit nachfolgender Entsalzung durchgeführt, da mit diesem Verfahren die Probe völlig salzfrei erhalten wurde und damit eine gute Trennung der Basen in der nachfolgenden Dünnschichtchromatografie erreicht werden konnte.

Mit 1 N Salzsäure wird RNA in Purinbasen und Pyrimidinnukleotide gespalten (Markham und Smith 1952). Diese Art der Hydrolyse eignet sich besonders dafür ein unbekanntes Nukleotid näher zu charakterisieren (siehe Abschnitt über Charakterisierung der Base "P"). Die Hydrolyse wurde bei 100⁰C mit 1 N Salzsäure 30 min durchgeführt (Björk und Svenson 1969). Da bei dieser Hydrolyse keine einheitlichen Reaktionsprodukte entstehen ist die nachfolgende Entsalzung schwierig.

2.10.2. Alkalische Hydrolyse

Die Spaltung von RNA mit Alkali liefert zum größten Teil Mononukleotide (Gemisch von 2'- und 3'-Phosphaten). Nicht

gespalten werden 2'-ribose-methylierte Nukleoside, so daß neben Mononukleotiden auch Di-, Tri-, Tetranukleotide usw. entstehen können. Äußerst alkaliresistent sind auch bestimmte Dinukleotide wie $m_2^6Apm_2^6Ap$ (Singh und Lane 1964). Weiterhin ist zu beachten, daß im alkalischen Milieu 1-Methyladenosin, 7-Methylguanosin, Dihydrouridin und andere modifizierte Nukleoside chemisch verändert werden (Dunn 1963, Randerath et al. 1972). Die Hydrolyse wird mit 0,3 N Kalilauge bei 37°C 16 Std. durchgeführt (Bock 1967). Die Lösung wird durch Zugabe von Perchlorsäure neutralisiert und die K^+ -Ionen als $KClO_4$ ausgefällt.

2.10.3. Enzymatische Hydrolysen

Enzymatische Hydrolysen haben gegenüber den chemischen Hydrolysen den Vorteil, daß sie spezifischer sind und unter milden Bedingungen ablaufen. Allerdings sind die RNA-abbauenden Enzyme relativ teuer und können für präparative Zwecke nicht immer eingesetzt werden.

Die Spaltung von RNA mit RNase T_2 verläuft nach einem ähnlichen Mechanismus wie die alkalische Hydrolyse. Auch bei der T_2 -Spaltung entstehen größtenteils 3'-Mononukleotide. RNase T_2 spaltet nicht nach ribose-methylierten Nukleosiden. Ca. 10 OD RNA wurden in 100 µl 0,05 K-Acetat-Puffer, pH = 4,5 mit einer Einheit des Enzyms gespalten (Brownlee 1972). Die Hydrolysedauer hängt ab von der Aktivität des Enzyms und betrug 6-12 Std.

Die Spaltung von RNA mit Schlangengift-diesterase, pankreatischer RNase und alkalischer Phosphatase liefert Nukleoside als einheitliche Reaktionsprodukte. Die Hydrolyse wird nach Vorschrift von Rogg et al. (1976) durchgeführt: 2-3 OD RNA werden in 200 µl Enzympuffer (0,02 M Ammoniumformiat, pH = 7,6; 0,5 mM $MgCl_2$, 25 µg pankreatische RNase, 30 µg Schlangengift-diesterase, 25 µg alkalische Phosphatase) bei 37°C 12 Std. verdaut. Zur Entfernung zyklischer Nukleotide wird danach mit 20 µg RNase T_1 nachgestartet und 1-2 Std. bei 37°C inkubiert. Das Hydrolysat kann direkt auf die Dünnschichtplatte aufgetragen werden.

2.11. Trennung von RNA-Bausteinen

Die in der Praxis verwendeten Methoden zur Trennung von Basen, Nukleosiden und Nukleotiden beruhen auf Ionenaustausch- und Verteilungschromatografie sowie elektrophoretischen Verfahren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Basen und Nukleotide durch Dünnschicht- und Papierchromatografie getrennt.

2.11.1. Dünnschicht- und Papierchromatografie von Basen

Zur zweidimensionalen Chromatografie wurden zwei Fließmittelkombinationen von Kahle et al. (1971) verwendet. Die Chromatografien wurden auf 20 x 20 cm Celluloseplatten aufsteigend durchgeführt. Folgende Fließmittel wurden verwendet:

Fließmittel A: Methanol/HCl/H₂O (65:17:18)

Fließmittel B: Butanol/Eisessig/H₂O (4:1:1)

Fließmittel C: ges. Ammoniumsulfat/i-Propanol/0,1 M Phosphatpuffer, pH = 6,0 (79:2:19)

Um eine gute Trennung der Basen zu erhalten sollten nicht mehr als 3 OD des Hydrolysats aufgetragen werden. Die Hauptbasen wurden unter der UV-Lampe (254 nm), die methylierten Basen durch Autoradiografie detektiert. Je nach aufgetragener Radioaktivitätsmenge mußten die Platten 7-28 Tage auf einem Röntgenfilm (Osray T₄) gelagert werden.

Die markierten Flecken wurden von der Celluloseschicht ausgekratzt und mit 200 µl 0,01 N HCl eluiert. Die Proben wurden mit der Cellulose in 10 ml Dioxanzsintillator gezählt. Die Ausbeute betrug 80-85%.

Die Papierchromatografie wurde zweidimensional auf Whatman Nr.1 oder Whatman 3MM (40 x 40 cm) mit den beschriebenen Fließmitteln absteigend durchgeführt. Da ca. 20-30 OD hydrolysierte RNA aufgetragen werden kann, eignet sich dieses Verfahren zu präparativen Zwecken.

2.12. Nukleosidanalyse von RNA durch nachträgliche ^3H -Markierung

Die von Randerath et al. (1971, 1972) beschriebene Methode zur Analyse der Nukleoside beruht auf folgendem Prinzip:

1. Die RNA wird enzymatisch zu Nukleosiden verdaut.
2. Der Riboseanteil der Nukleoside wird mit Natriumperjodat oxidiert.
3. Der gebildete Nukleosiddialdehyd wird mit tritiiertem Kaliumborhydrid reduziert. Die radioaktive Markierung befindet sich am C_2 und C_3 der ursprünglichen Ribose.
4. Die verschiedenen Nukleosidtrialkohole werden durch zweidimensionale Dünnschichtchromatografie auf Cellulosefolien getrennt und durch Fluorografie auf dem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Die einzelnen Schritte der Derivatisierung sind auf Seite 20 schematisch dargestellt.

2.12.1. Derivatisierung von Nukleosiden

Die enzymatische Hydrolyse der RNA wurde bei 37°C , 8 Std. im schwach alkalischen Milieu durchgeführt. Der Ansatz enthielt folgende Komponenten:

Bicin/NaOH pH = 8,0	3 μmol
MgCl_2	1 μmol
RNA	2-2,5 OD
Schlangengiftdiesterase	20 μg
pankreatische RNase	20 μg
alkalische Phosphatase	15 μg
A. bidest.	ad 100 μl

Die Aktivität von Schlangengiftdiesterase und alkalischer Phosphatase wurde mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat nach der von Worthington herausgegebenen Vorschrift ermittelt. Die Aktivität der pankreatischen RNase wurde mit Hefe-RNA als Substrat nach Vorschrift von Boehringer bestimmt.

(Ap)₁₀ (Gp)₁₀ (Cp)₁₀ (Up)₁₀ (1 nmol)

VERDAUUNG ZU NUKLEOSIDEN

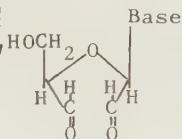
PANKREATISCHE RIBONUKLEASE
SCHLANGENGIFTDIESTERASE
ALKALISCHE PHOSPHATASE
pH 8, 37°C, 8 Std.

A (10 nmol) + G (10 nmol) + C (10 nmol) + U (10 nmol)

OXIDATION

NaJO₄ (100 nmol)
pH 6, 23°C, 2 Std.

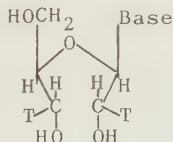
NUKLEOSIDDIALDEHYDE



TRITIUM EINBAU

KBH₄-T (500 nmol, 2 mCi)
pH 8, 23°C, 2 Std.

TRITIUM MARKIERTE
TRIALKOHOLE



A' (20 uCi) + G' (20 uCi) + C' (20 uCi) + U' (20 uCi)

DÜNN SCHICHT CHROMATOGRAPHIE
EINES ALIQUOTS VON 1 %
RADIOAKTIVITÄTSBESTIMMUNG

A' (4,4 x 10⁵ dpm) + G' (4,4 x 10⁵ dpm) + C' (4,4 x 10⁵ dpm)
+ U' (4,4 x 10⁵ dpm)

Abb. 1: Analyse der Basenzusammensetzung von Ribopolynukleotiden durch enzymatische Hydrolyse und stöchiometrischem Tritium Einbau

Die Oxidation des Hydrolysats erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln (2 Std.)

Hydrolysat	10 μ l = 40 nmol Nukleosid
20 mM NaJO ₄	5 μ l = 100 nmol
A. bidest.	ad 50 μ l

Nach der Oxidation wurde der Ansatz in Eiswasser gestellt und 5 μ l 0,15 M Phosphatpuffer, pH = 6,8 zugegeben. Die Vollständigkeit der Oxidation mit Natriumperjodat wurde mit Cytosin als Standard durch Messung der Absorption bei 240 nm überprüft. Die Oxidation mit Perjodat ist spezifisch für Ribonukleoside. Desoxyribonukleoside und ribose-methylierte Nukleoside werden nicht oxidiert (keine vicinalen Hydroxylgruppen) und können mit dieser Methode nicht bestimmt werden. Geringe Verunreinigungen der RNA mit Polysacchariden machen eine quantitative Analyse sehr schwierig, da deren Oxidations- und Reduktionsprodukte mit Nukleosiden im zweidimensionalen Chromatogramm überlappen.

Die Reduktion wurde mit einem fünffachen Überschuß an tritiiertem Kaliumborhydrid gegenüber Natriumperjodat durchgeführt (2 Std. bei Raumtemperatur im Dunkeln). Hierzu wurde dem oxidierten Hydrolysat 5 μ l (= 500 nmol) 0,1 N ³H-KBH₄ (in 0,1 N Kalilauge) mit einer spezifischen Aktivität von 4-6 Ci/mmol zugesetzt. Die Zugabe muß unter einem gut ziehenden Abzug erfolgen (Vorsicht: radioaktiver Wasserstoff entweicht!). Der pH-Wert steigt während der Reaktion auf 8,4 an.

Die Reduktion wurde durch Zugabe von 200 μ l 1 N Essigsäure gestoppt (Vorsicht: radioaktiver Wasserstoff entweicht!). Nach 30 min wurde der Reaktionsansatz in einem kleinen Spitzkölbchen am Rotationsverdampfer zur Trockne abgezogen. Der Rückstand wurde in 50 μ l 0,1 N Ameisensäure aufgenommen, davon 1 μ l in 10 ml Dioxanszintillator gezählt und der Rest bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen kann diese Probe ohne weitere Aufarbeitung zur Dünnschichtchromatografie verwendet werden.

Tritium-markierte Vergleichssubstanzen wurden aus käuflichen Nukleosiden (Cyclo-Chemical Corp., Merck) nach dem gleichen

Verfahren hergestellt. Der Hydrolyseschritt wurde weggelassen. Die Reaktion mit nahezu allen umgesetzten Nukleosiden verlief quantitativ. Geringe Ausbeuteverluste traten lediglich bei der Umsetzung von 7-Methylguanosin auf (dieses Nukleosid ist alkalilabil). Nach Randerath et al. (1972) können bei der Umsetzung dieses methylierten Nukleosids Verluste bis zu 40% auftreten. Unter den hier beschriebenen Bedingungen wurde m^7G zu etwa 90% umgesetzt. Die bei der Nukleosidanalyse von tRNAs erhaltenen Werte für m^7G wurden nicht korrigiert.

2.12.2. Chromatografie des markierten Hydrolysats

1-5 μ l des markierten Hydrolysats (= 0,8-4 nmol Nukleosidtrialkoholgemisch) wurden auf Cellulose-Plastikfolien aufgetragen. In der ersten Dimension wurde mit Fließmittel F, in der zweiten Dimension mit Fließmittel G entwickelt (Randerath et al. 1974). Die zweite Dimension wurde durch Anheften von 5 cm Whatman Nr.1 Papier verlängert (bessere Trennung von m^7G und G). Zwischen den Chromatografien wurden die Folien ca. 3 min mit dem heißen Föhn getrocknet.

Fließmittel F: Acetonitril/4 N Ammoniak (3,4:1)

Fließmittel G: tert. Amylalkohol/Methyläthylketon/Acetonitril/Äthylacetat/ H_2O / conc. Ameisensäure (4:2:1,5:2:1,5:0,18)

Abb. 1 zeigt die Trennung von Nukleosidtrialkoholen durch zweidimensionale Dünnschichtchromatografie mit den oben genannten Fließmitteln.

2.12.3. Fluorografie

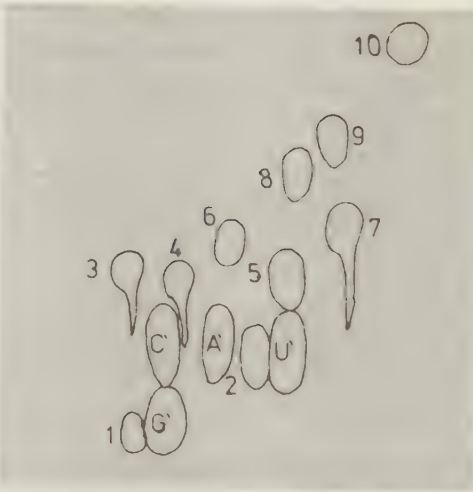
Im Gegensatz zum ^{14}C -Zerfall ist die Energie des 3H -Zerfalls zu gering, um auf einem Röntgenfilm Schwärzungen hervorzurufen. Dieser Nachteil von 3H -Verbindungen kann teilweise aus-

a)



b)

1. Dimension: Fließmittel F



2. Dimension: Fließmittel G

Abb. 2: Zweidimensionale Trennung von Nukleosidtrialkoholen auf Cellulose-Plastikfolien

a) Fluorogramm (2×10^6 cpm, 2 Tage bei -70°C)

b) schematische Darstellung der Lage der verschiedenen Nukleosidtrialkohole

1 = m^7_G 2 = m^2_G 3 = m^1_A 4 = m^5_C 5 = m^2_G
 6 = m^1_G 7 = m^5_U 8 = m^6_A 9 = m^2_A 10 = $m^2_{i6}_A$

geglichen werden durch Aufsprühen von Szintillationslösungen auf die Dünnschichtplatten nach beendeter Chromatografie. Die Schwärzung des Röntgenfilms wird in diesem Fall primär von Photonen des Szintillators ausgelöst, die wiederum durch ^3H -Zerfälle entstehen. Die Fluorografie wird im Gegensatz zur Autoradiografie (β -Strahler verursachen direkt die Schwärzung des Röntgenfilms) bei relativ tiefen Temperaturen (-40°C bis -70°C) durchgeführt (Randerath et al. 1970).

Eine Lösung von 7% PPO in Äther wird über das entwickelte Chromatogramm gegossen und durch leichtes Schütteln gleichmäßig verteilt. Die Folie wird waagrecht gelegt bis der Äther verdampft ist. Das Chromatogramm wird dann auf einen Röntgenfilm (Kodak RP X-Omat) gelegt, mit Tesafilm fixiert und in einer lichtdichten Kasette bei -70°C 5-6 Tage exponiert.

Die Nukleosidtrialkohole wurden mit 0,5 ml 2 N Ammoniak aus der Cellulose eluiert, zentrifugiert und 0,4 ml des Überstands in 10 ml Dioxanszintillator gezählt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Modifikation der tRNA von *E. coli*, *B. subtilis* und *M. lysodeikticus*

Die Muster der methylierten Basen der tRNAs von *E. coli* und *B. subtilis* weisen einige charakteristische Unterschiede auf (Arnold und Kersten 1973, Domdey 1974):

- (i) In der tRNA von *B. subtilis* findet sich kein radioaktiv markiertes Ribothymidin, wenn die Bakterien in einem Medium gezüchtet werden, das $^{14}\text{CH}_3$ -Methionin enthält. In *E. coli* tRNA macht Ribothymidin fast fünfzig Prozent der $^{14}\text{CH}_3$ -markierten Basen aus.
- (ii) *B. subtilis* tRNA enthält 1-Methyladenosin, ein methyliertes Nukleosid, das für tRNAs von Eukaryoten charakteristisch ist.
- (iii) In tRNA von *B. subtilis* kommt ein unbekanntes methyliertes Nukleosidderivat in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Zellen vor; es wurde mit dem Buchstaben "P" bezeichnet.

Die folgenden Abschnitte behandeln die Frage, ob diese Besonderheiten der methylierten Basen von *B. subtilis* tRNA auch für tRNAs anderer grampositiver Bakterien gelten.

3.1.1. Methylierte Basen von *B. subtilis* tRNA

Die radioaktiv markierten methylierten Basen der tRNA von *B. subtilis*, die nach Markierung der Zellen mit $^{14}\text{CH}_3$ -Methionin entstehen, sind in Abb. 3 gezeigt. Die Hauptmenge der markierten Basen machen die methylierten Guanine (m^7G , m^1G und m^2G) aus. Stark markiert wird auch 1-Methyladenin. Als weitere markierte Produkte werden 2-Methyladenin, 6-Methyladenin und die nicht identifizierten Basen P und X gefunden. Dagegen weist

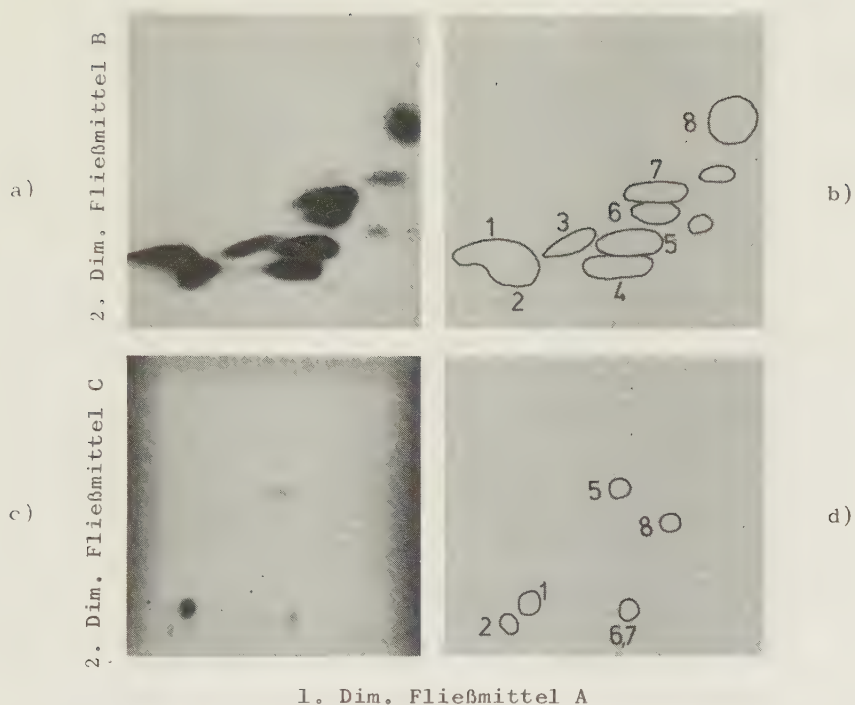


Abb. 3: Muster der methylierten Basen der tRNA aus *B. subtilis* nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatografie in verschiedenen Fließmittelsystemen

a) und c) Autoradiografie

b) und d) schematische Darstellung der Lage der verschiedenen methylierten Basen

1 = m⁷G 2 = m¹G 3 = m²G 4 = X 5 = m¹A 6 = m²A
 7 = m⁶A 8 = P

5-Methyluracil keine radiaktive Markierung auf. Die quantitative Auswertung kann Tab. 1a entnommen werden. Die Ergebnisse wurden durch Verwendung zweier Fließmittelsysteme, welche die einzelnen Basen unterschiedlich gut trennen, abgesichert.

3.1.2. Nukleosidanalyse der tRNA von *E. coli*, *B. subtilis* und *M. lysodeikticus*

Die Nukleosidanalyse von tRNA nach Randerath et al. (1971, 1972) ermöglicht die nachträgliche Markierung von Nukleosiden mit Tritium. Die Analyse wurde durchgeführt, um zu klären, ob in der tRNA von *B. subtilis* und *M. lysodeikticus*, einem weiteren Vertreter der grampositiven Bakterien, Ribothymidin vorkommt. Diese Methode hat gegenüber einer Methode, mit der die modifizierten Basen durch UV-Absorption erkannt werden, den Vorteil größerer Empfindlichkeit. Zum Vergleich wurden die tRNAs von *E. coli*, *B. subtilis* und *M. lysodeikticus* analysiert.

Die Muster der Nukleosidderivate von Gesamt-tRNA aller drei Bakterienstämme sind in Abb. 4 gezeigt. Die starken Flecken repräsentieren die vier Hauptnukleoside Adenosin, Guanosin, Cytidin und Uridin. An modifizierten Nukleosiden sind 7-Methylguanosin, Pseudouridin, 1-Methylguanosin, Dihydrouridin, 6-Methyladenosin und Ribothymidin in der tRNA aller drei Stämme nachzuweisen. In Gesamt-tRNA von *B. subtilis* und *M. lysodeikticus* wird auch mit dieser Methode 1-Methyladenosin gefunden. Als radioaktive Flecken nicht sichtbar sind 2-Methylguanosin, 2-Methyladenosin sowie die Nukleoside X und P. Der Grund hierfür ist einmal darin zu suchen, daß Verbindungen wie m^2G und m^2A nur in ein oder zwei tRNA-Spezies vorkommen und ihre Konzentration bei der Analyse von Gesamt-tRNA unterhalb der Nachweisgränze dieser Methode liegt. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß ein bestimmtes Nukleosid, wie z.B. P nicht von einem der Hauptnukleoside abgetrennt wird. Die mit "b" bezeichneten Flecken sind "background spots" und werden auf dem Fluorogramm auch dann gefunden, wenn man die tRNA aus dem Hydrolysat weg-

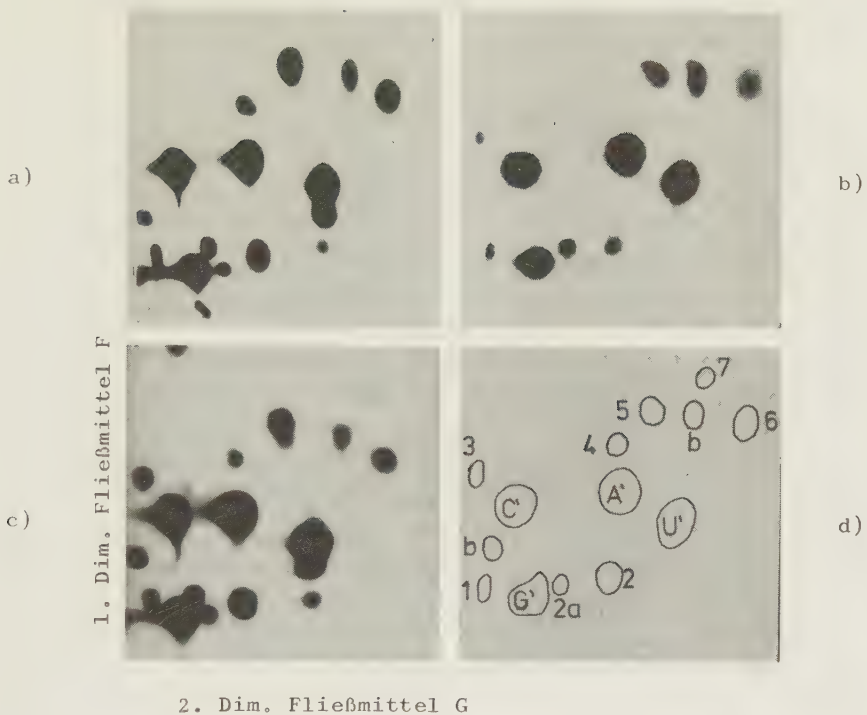


Abb. 4: Muster der ^3H -markierten Nukleosidtrialkohole nach zweidimensionaler Chromatografie

- a) von tRNA aus *E. coli*
- b) von tRNA aus *B. subtilis*
- c) von tRNA aus *M. lysodeikticus*
- d) schematische Darstellung der Lage der verschiedenen Nukleosidderivate

$1 = m^7G'$ $2 = \psi'$ $2a = \psi'-D$ $3 = m^1A'$ $4 = m^1G'$
 $5 = hU'$ $6 = m^5U'$ $7 = m^6A'$ $b = \text{"background spot"}$

läßt (proteinspezifische Flecken). Ψ -D ist ein Umwandlungsprodukt von Pseudouridin, das bei der Oxidation mit Perjodat entsteht.

Die quantitative Auswertung der Analysen sind in Tab. 1a gezeigt, wobei die Nukleosidanalysen nach Randerath und die $^{14}\text{CH}_3$ -Markierungen der tRNAs von *E. coli* und *B. subtilis* zusammengefaßt sind. Da *M. lysodeikticus* nicht in einem Minimalmedium gezüchtet werden konnte, mußte auf eine Markierung mit radioaktivem Methionin verzichtet werden. Die ^3H -Markierung zeigt, daß mit Ausnahme von 1-Methyladenosin die anderen methylierten Nukleoside in allen drei Bakterienstämmen vorkommen. Pseudouridin und Dihydrouridin sind in *E. coli* tRNA stärker vertreten als in der tRNA der beiden grampositiven Keime. In *E. coli* und *B. subtilis* macht Ribothymidin 1,02 Molprozent aller Nukleoside aus, was etwa einem m^5U -Rest pro tRNA entspricht. In der tRNA von *M. lysodeikticus* liegt der Gehalt an Ribothymidin jedoch wesentlich niedriger. Das bedeutet, daß nur etwa jedes dritte tRNA-Molekül von *M. lysodeikticus* Ribothymidin enthält. Ein vergleichbar niedriger m^5U -Gehalt wurde bei Prokaryoten bisher nur für tRNA von Mycoplasmen (Johnson et al. 1970) gefunden.

In Tab. 1b wird die Tritium-Markierung mit der $^{14}\text{CH}_3$ -Markierung in Bezug auf die methylierten Basen in der Gesamt-tRNA von *E. coli* und *B. subtilis* verglichen. Es zeigt sich, daß die relative Häufigkeit der einzelnen methylierten Basen in der tRNA von *E. coli* mit beiden Markierungsmethoden recht gut übereinstimmt. Beim Vergleich der Ergebnisse beider Analysemethoden mit tRNA von *B. subtilis* treten jedoch erhebliche Differenzen auf. Diese Differenzen können damit erklärt werden, daß die Methylgruppe von m^5U in der tRNA von *B. subtilis* nicht mit $^{14}\text{CH}_3$ -Methionin markiert wird, während alle anderen Methylgruppen aus dieser Vorstufe entstehen.

Tab. 1a: Analyse der tRNA von E. coli, B. subtilis und M. lysodeikticus - Chemische ^3H -Markierung nach Randerath und $^{14}\text{CH}_3$ -Methionin Einbau in vivo

Verbindung	Prozent der Gesamtradioaktivität					
	^3H -Markierung			$^{14}\text{CH}_3$ -Methionin Einbau		
	E. coli	B. subt.	M. lys.	E. coli a)	B. subt.	M. lys.
G	28,7	28,8	27,9			
C	31,1	28,4	28,6			
A	18,5	16,9	17,8			
U	15,9	19,0	21,7			
∅	2,41	1,48	1,25			
hU	1,61	1,26	0,83			
^1mG	0,23	0,17	0,13	4,1	9,4	
^2mG	b)	b)	b)	1,0	5,1	
^7mG	0,65	0,60	0,39	30,0	31,1	
^1mA	-	0,30	0,32	-	20,4	
$^6\text{mA} + \text{mA}$	0,18	0,23	0,14	13,8	14,9	
X	b)	b)	b)	5,8	5,1	
P	-	b)	b)	-	12,9	
^5U	1,02	1,02	0,43	43,8	-	

a) aus Arnold (1973) b) kein radioaktiver Fleck nachweisbar

Tab. 1b: Vergleich der ^3H -markierten und $^{14}\text{CH}_3$ -markierten methylierten Nukleoside der Gesamt-tRNA von *E. coli* MRE 600 und *B. subtilis* W 23

Verbindung	Prozent methylierte Nukleoside ^{a)}			
	<i>E. coli</i>		<i>B. subtilis</i>	
	^3H	$^{14}\text{CH}_3$	^3H	$^{14}\text{CH}_3$
$m^5\text{U}$	49,0	47,8	44,0	-
$m^1\text{G} + m^7\text{G}$	42,4	37,2	33,2	53,4
$m^2\text{A} + m^6\text{A}$	8,7	15,0	9,9	10,7
$m^1\text{A}$	-	-	12,9	26,9

a) $m^2\text{G}$, P und X wurden hierbei nicht berücksichtigt

3.2. Biosynthese von Ribothymidin in tRNAs grampositiver und gramnegativer Bakterien

Die Biosynthese von Ribothymidin in den bisher untersuchten gramnegativen Stämmen *Escherichia coli* (Arnold und Kersten 1973, Klagsbrun 1973), *Pseudomonas aeruginosa* (Klagsbrun 1973) und *Salmonella typhimurium* (Cimino und Salvatore 1976) erfolgt SAM-abhängig. Bei den grampositiven Stämmen *B. subtilis* (Arnold, Schmidt und Kersten 1975) und *Streptococcus faecalis* (Delk und Rabinowitz 1975) wird die Methylgruppe von einem anderen Donor auf einen Uridinrest in der tRNA übertragen. Die bisher verfügbaren Daten sprechen dafür, daß ein Derivat der Tetrahydrofolsäure am Methylgruppentransfer beteiligt ist. Es interessierte nun die Frage, ob die m^5U -spezifische tRNA-Methyltransferase aller grampositiven Mikroorganismen ein Derivat der Tetrahydrofolsäure als Coenzym benötigt. Diese Frage kann nur beantwortet werden, wenn eine Reihe weiterer grampositiver Bakterien auf diesen Stoffwechselweg hin untersucht werden. Diese Untersuchungen könnten Aufschluß über die Evolution der tRNA-Methyltransferasen geben und darüberhinaus zur biochemischen Klassifizierung von Mikroorganismen beitragen.

3.2.1. Hemmung der Biosynthese von Ribothymidin in tRNA grampositiver Bakterien durch Trimethoprim

Mit Inhibitoren des Folsäure-Stoffwechsels, wie Aminopterin und Trimethoprim, ist es möglich das Wachstum von Bakterien zu hemmen. Von Trimethoprim ist bekannt, daß es als kompetitiver Inhibitor der Dihydrofolsäurereduktase wirkt (Burchall und Hitchings 1965). Die Gabe dieses Antibiotikums führt primär zu einem Mangel an Tetrahydrofolsäure und ihrer Derivate. Als Folge dieses Mangels werden THF-abhängige Metabolite der Bakterienzelle wie Purine, Desoxythymidin, Methionin und Glycin nicht weiter in ausreichendem Maße synthetisiert. Wegen des Mangels an Vorstufen werden auch DNA, RNA und Proteine nicht mehr gebildet. Weiterhin wird die Formylierung der methionyl-

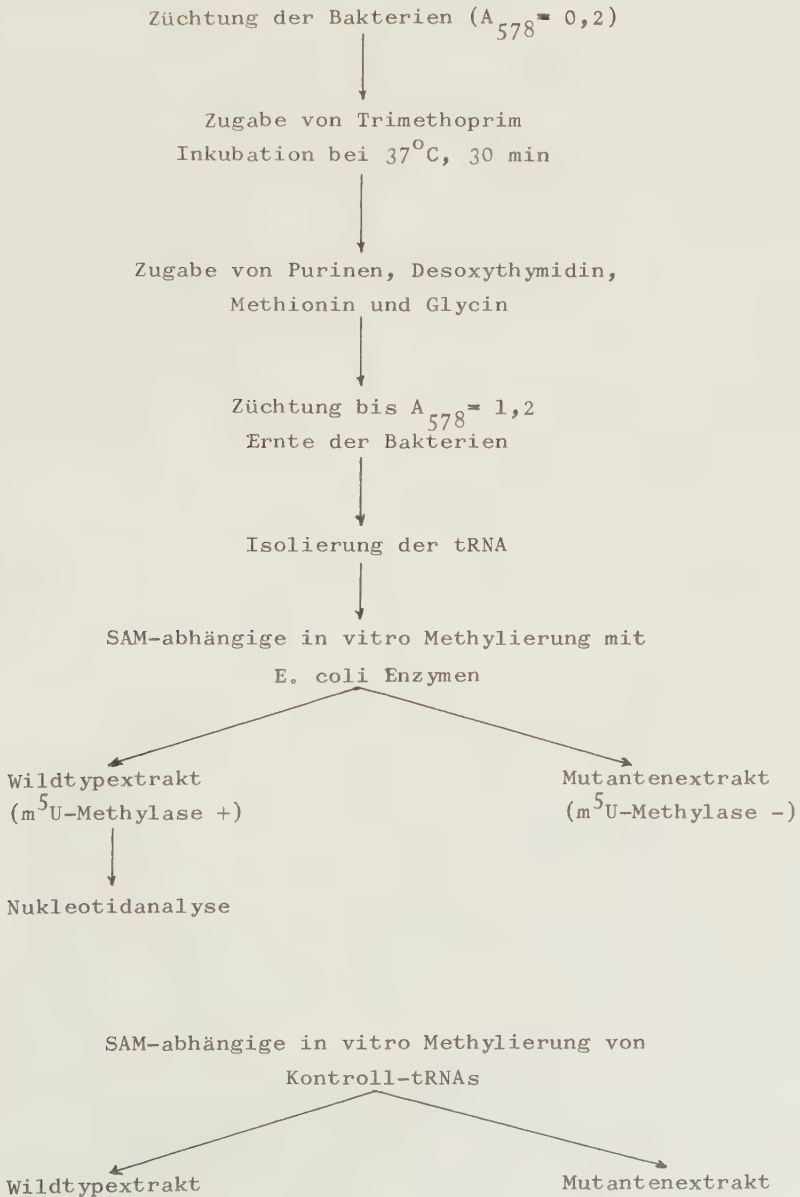
tRNA^{Met}_f, welche die Initiation der Proteinsynthese einleitet, gehemmt (Eisenstadt und Lengyel 1966, Clark und Marcker 1966).

Die Hemmung des Wachstums durch Trimethoprim läßt sich jedoch weitgehend aufheben, wenn Purine, Desoxythymidin, Methionin und Glycin dem Medium zugeführt werden (Harvey 1973). Arnold und Kersten (1975) konnten zeigen, daß nach Gabe von Trimethoprim und Zusatz von Purinen, Desoxythymidin, Methionin und Glycin die Synthese von Uridin zu Ribothymidin in der tRNA von *B. subtilis* um 90% gegenüber unbehandelten Zellen vermindert ist. Die isolierte tRNA ist m⁵U-arm und kann mit Enzymextrakten aus *E. coli* und S-Adenosylmethionin in vitro methyliert werden (Arnold, Schmidt, Raettig, Sandig, Domdey und Kersten 1976). Auch mit dem homologen Enzymextrakt konnte eine m⁵U-arme tRNA aus *B. subtilis* methyliert werden, wenn ein radioaktiv markiertes Folsäurederivat (Tetrahydrofolsäure + radioaktiver Formaldehyd) als Methylgruppendonator dem Reaktionsansatz zugegeben wurde (Kersten, Sandig und Arnold 1975). Allerdings läuft diese Reaktion mit einer relativ schlechten Ausbeute von ca. 5 % ab. Zur quantitativen Auswertung ist zusätzlich eine Basenanalyse erforderlich. Deshalb wurden alle weiteren Untersuchungen mit dem heterologen Enzymextrakt aus *E. coli* durchgeführt.

Mit der Möglichkeit, die THF-abhängige Biosynthese von Ribothymidin durch Trimethoprim zu hemmen und der weiteren Möglichkeit, m⁵U-arme tRNA in vitro mit SAM und Enzymextrakten aus *E. coli* zu methylieren, war die Voraussetzung geschaffen, die Biosynthese von Ribothymidin in verschiedenen Bakterienstämmen systematisch zu untersuchen. Das Prinzip dieser Untersuchungen ist im folgenden kurz zusammengefaßt und auf Seite 34 schematisch dargestellt.

Die verschiedenen grampositiven und gramnegativen Bakterienstämme werden in Minimal- oder Maximalmedium bis zu einer optischen Dichte von 0,2 gezüchtet. Nach Trimethoprimgabe und 30 min Inkubation werden Purine, Desoxythymidin, Methionin und

Schema zur Aufklärung der Biosynthese von Ribothymidin
in tRNAs von Bakterien



Glycin zugesetzt und die Kulturen bis in die stationäre Phase ($A_{578} = 1,2$) weiter gezüchtet. Die Zellen werden geerntet und die tRNA isoliert. Für die nachfolgende in vitro Methylierung dieser tRNAs mit ^{14}C -SAM werden Enzymextrakte (S-100) aus *E. coli* MRE 600 (Wildtyp) und *E. coli* IB 5 (Mutante) verwendet. Der Wildtypstamm enthält alle *E. coli* spezifischen tRNA-Methyltransferasen. Der Mutante fehlt die $m^5\text{U}$ -spezifische Methylase. Aus der ermittelten Differenz im Ausmaß der Methylierung mit beiden Enzymextrakten kann man die spezifische Methylierung von U zu $m^5\text{U}$ berechnen. In einigen Fällen wurden die Produkte der Methylierung durch Dünnschichtchromatografie identifiziert. Werden die entsprechenden tRNAs aus den unbehandelten Zellen methyliert, so liefert der Vergleich mit der Methylierung der tRNAs aus Trimethoprim behandelten Zellen eine eindeutige Aussage darüber, ob Ribothymidin in vivo SAM-abhängig oder THF-abhängig synthetisiert wird.

3.2.2. Wachstum der Bakterien unter dem Einfluß von Trimethoprim

Die Bakterien wurden nach Möglichkeit in einem synthetischen Minimalmedium gezüchtet. Im nährstoffarmen Medium läßt sich nach Gabe des Antibiotikums in der Regel eine vollständige Hemmung des Wachstums erzielen (Abb. 5a und Tab. 2). Wenn für bestimmte Bakterienstämme kein geeignetes Minimalmedium zur Verfügung stand, wurde ein komplexes, nährstoffreiches Medium verwendet. Der Zusatz von Trimethoprim führt im Maximalmedium nicht zu einer vollständigen Hemmung des Wachstums, sondern in der Regel nur zu einer 30-40%igen Verminderung der Wachstumsgeschwindigkeit (Abb. 5b und Tabelle 2). Auch Dosierungen des Antibiotikums bis zu 100 $\mu\text{g/ml}$ bewirken keine stärkere Hemmung des Wachstums. Mit Purinen, Desoxythymidin, Methionin und Glycin wird im Gegensatz zum Wachstum im Minimalmedium keine Aufhebung der Wachstumshemmung erreicht. Das läßt vermuten, daß die Tetrahydrofolsäure-abhängigen Metabolite in ausreichendem Maße im Maximalmedium vorhanden sind und deshalb eine Zufuhr

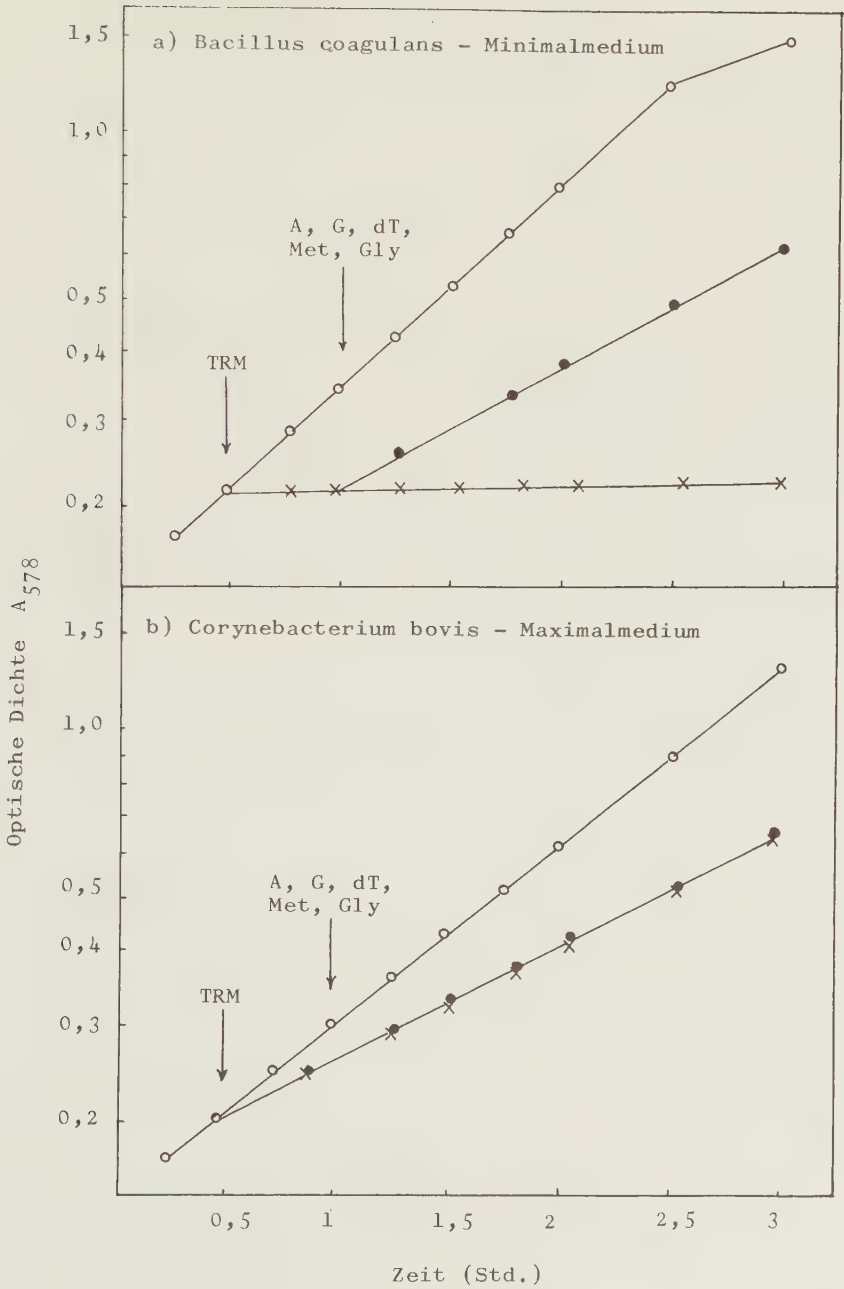


Abb. 5: Wachstum gramnegativer Bakterien unter dem Einfluß von Trimethoprim und Tetrahydrofolsäure-abhängiger Stoffwechselprodukte

a) *Bacillus coagulans* in Minimalmedium

b) *Corynebacterium bovis* in Maximalmedium

Trimethoprim (*B. coagulans* 10 mg/l, *C. bovis* 25 mg/l) wurde den Bakterienkulturen bei einer optischen Dichte von 0,2 zugesetzt. Nach 30 min wurden Guanosin, Adenosin, Desoxythymidin (je 100 mg/l) sowie die Aminosäuren Methionin und Glycin (je 20 mg/l) zugegeben.



Kontrolle



+ TRM



+ TRM + THF-abhängige Metabolite

Tab. 2: Hemmung des Wachstums grampositiver und gram-negativer Bakterien in verschiedenen Medien durch Trimethoprim (TRM)

Bakterienstamm	Medium	TRM ug/ml	Prozent Hemmung
<u>grampositive Bakterien</u>			
Bacillus brevis	B	10	86
Bacillus circulans	B	10	100
Bacillus licheniformis	B	10	100
Bacillus macerans	B	10	92
Bacillus megaterium	B	10	100
Bacillus pumilis	C	25	39
Bacillus stearothermoph.	C	25	31
Bacillus subtilis	B	10	100
Arthrobacter albidus	A	25	29
Corynebacterium bovis	A	25	44
Micrococcus lysodeikticus	A	25	37
Micrococcus varians	A	25	35
Staphylococcus aureus	A	25	42
Streptococcus faecium	A	25	38
<u>gramnegative Bakterien</u>			
Escherichia coli	B	10	100
Pseudomonas aeruginosa	B	100	73
Rhizobium lupini	E	25	72
Serratia marcescens	B	10	100
Salmonella typhimurium	B	10	93
Xanthomonas pruni	B	100	89

A,C,E = Maximalmedien B = Minimalmedium

Die Zusammensetzung der Medien ist unter Material und Methoden angegeben.

dieser Stoffe keinen Einfluß ausübt. Die Hemmung des Wachstums durch Trimethoprim scheint im Maximalmedium in erster Linie auf den Mangel an formylierter methionyl-tRNA_f^{Met} zurückzuführen sein. Mit unformylierter Initiator-tRNA ist auch die Proteinsynthese vermindert (Arnold, persönliche Mitteilung). Auch im Minimalmedium wird nach Zusatz der THF-abhängigen Stoffwechselprodukte die Hemmung des Wachstums nicht vollständig aufgehoben (siehe Abb. 5a). Die Resthemmung könnte ebenfalls auf eine verminderte Proteinsynthese als Folge verlangsamer Initiation durch unformylierte methionyl-tRNA_f^{Met} zurückzuführen sein.

Auffällig ist, daß 100 µg/ml Trimethoprim bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Xanthomonas pruni* auch im Minimalmedium nicht ausreichen, um eine vollständige Hemmung des Wachstums hervorzurufen (Tab. 2). Diese Resistenz gegenüber dem Antibiotikum ist wahrscheinlich bedingt durch eine geringe Durchlässigkeit der Zellmembran für Trimethoprim. Als ähnlich resistent erwies sich *Bacillus cereus*, der mit einer Trimethoprimkonzentration von 100 µg/ml nur schwach gehemmt wurde (in der Tabelle nicht aufgeführt).

3.2.3. Methylierung der tRNAs in vitro

In Abb. 6 ist als Beispiel einer Methylierungskinetik der zeitliche Verlauf der Methylierung von tRNA aus Trimethoprim behandeltem und unbehandeltem *B. subtilis* mit ¹⁴C-SAM und Enzymextrakt aus *E. coli* MRE 600 dargestellt. Die Kinetik dieser Methylierungen zeigt, daß erst nach 90-120 min das Ende der enzymatischen Reaktion erreicht ist. Die tRNA aus den behandelten Zellen wird etwa achtmal besser methyliert als die tRNA aus unbehandeltem *B. subtilis*. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß die tRNA aus den behandelten Zellen nicht vollständig methyliert ist.

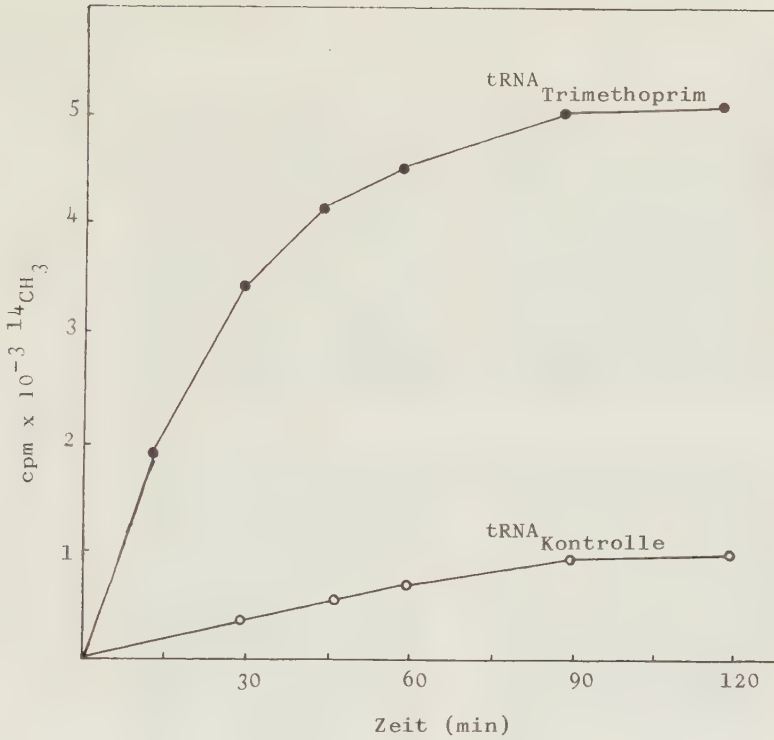


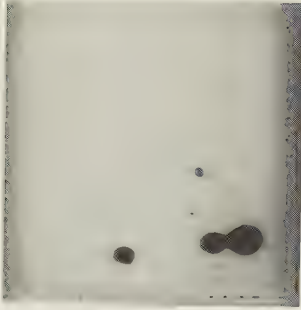
Abb. 6: Kinetik der heterologen Methylierung von tRNA aus unbehandelten und mit Trimethoprim behandelten *B. subtilis* mit ^{14}C -SAM und Enzymextrakt aus *E. coli* MRE 600. Trimethoprimkonzentration siehe Tab. 2

In einer Reihe weiterer Experimente wurde geprüft, ob Ribothymidin dasjenige Nukleosid ist, welches durch das heterologe Enzym in die tRNA eingeführt wird. Hierzu wurde die tRNA aus Trimethoprim behandelten grampositiven Bakterien (*Arthrobacter albidus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus coagulans*, *Corynebacterium bovis*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus*) mit ^{14}C -SAM und *E. coli* Enzym methyliert, die markierten tRNAs mit RNase T_2 hydrolysiert und die gebildeten 3'-Mononukleotide durch zweidimensionale Dünnschichtchromatografie getrennt. Die Autoradiografien dieser Chromatogramme sind in Abb. 7 dargestellt. Die Hauptmenge der Radioaktivität wird in der Position von $m^5\text{Up}$ gefunden. Daneben tauchen schwächere markierte Flecken auf den Autoradiogrammen auf. Es handelt sich hierbei um $m^7\text{Gp}$, $m^1\text{Gp}$ und einige nicht identifizierte Nukleotide. Diese schwächeren Flecken stellen Methylierungsprodukte dar, die in heterologen Systemen oft auftreten. Sie sind spezifisch für die Herkunft der tRNA und die Herkunft des Enzymextraktes. Setzt man die Radioaktivität aller Methylierungsprodukte der tRNA gleich 100 %, so macht die Radioaktivität in $m^5\text{Up}$ im Durchschnitt etwa 85 % aus (Tab. 3). Diese Ergebnisse stützen die Annahme, daß tRNAs aus Trimethoprim behandelten grampositiven Bakterien $m^5\text{U}$ -arm sind.

Tab. 3: Bildung von Ribothymidin in tRNAs aus Trimethoprim behandelten grampositiven Bakterien durch heterologe Methylierung mit ^{14}C -SAM und Enzymextrakt aus *E. coli*

tRNA-Quelle	cpm Gesamt	cpm in $m^5\text{Up}$	Prozent in $m^5\text{Up}$
A. albidus	16.980	13.131	77,0
B. brevis	17.460	15.150	86,8
B. coagulans	25.890	23.004	88,6
C. bovis	16.031	14.772	92,1
M. lysodeikticus	35.144	31.530	89,8
S. aureus	17.369	14.676	84,5

a)



b)



c)



d)



e)



f)



. Dim. Fließmittel D

2. Dim. Fließmittel E

Abb. 7: Muster der methylierten Nukleotide nach heterologer Methylierung von tRNAs aus Trimethoprim behandelten grampositiven Bakterien mit ^{14}C -SAM und Enzymextrakt aus *E. coli*

- | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| a) <i>Arthrobacter albidus</i> | b) <i>Bacillus brevis</i> |
| c) <i>Bacillus coagulans</i> | d) <i>Corynebacterium bovis</i> |
| e) <i>Micrococcus lysodeikticus</i> | f) <i>Staphylococcus aureus</i> |

Offene Kreise: Hauptnukleoside Gp, Ap, Cp, Up

Die Hauptmenge der Radioaktivität erscheint in $m^5\text{Up}$.
Die schwächeren Flecken wurden nicht identifiziert.

Für die weiteren Untersuchungen zur Biosynthese von Ribothymidin in grampositiven und gramnegativen Bakterien wurde auf eine Produktanalyse verzichtet. Die Methylgruppenaufnahme in vitro wurde mit ^{14}C -SAM als Methylgruppendonor und Enzymextrakten aus *E. coli* MRE 600 (Wildtyp) und *E. coli* IB 5 (m^5U -Mutante) getestet. Die Menge an Methylgruppen, die in m^5U eingebaut wird, kann aus der Differenz der Methylierung mit Wildtypextrakt und Mutantenextrakt ermittelt werden. In Tab. 4 ist die Methylgruppenaufnahme von tRNAs aus Trimethoprim behandelten Bacillaceae, Micrococcaceae, *Arthrobacter albidus*, *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus faecium* angegeben. In die tRNAs dieser mit Trimethoprim behandelten grampositiven Bakterien können im Durchschnitt 0,4 Methylgruppen eingeführt werden, wenn der Enzymextrakt aus *E. coli* Wildtyp verwendet wird. Mit Extrakten aus der Mutante, der die m^5U -spezifische tRNA-Methyltransferase fehlt, kann nur jede zwanzigste tRNA eine Methylgruppe aufnehmen. Das Ausmaß der Methylierung (Endmethylierung nach 2 Std.) ist um eine Größenordnung kleiner. Kein Unterschied in der Methylierbarkeit mit beiden Enzymextrakten wird bei tRNA aus Trimethoprim behandelten *Bacillus stearothermophilus* gefunden.

Analoge Ergebnisse wie für die tRNA von *B. stearothermophilus* wurden bei allen untersuchten gramnegativen Bakterien (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizobium lupini*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Xanthomonas pruni*) erhalten (Tab. 5). Die Methylierung mit beiden Enzymextrakten aus dem Wildtyp und der Mutante sind gleich und sehr niedrig. Danach sind tRNAs aus mit Trimethoprim behandelten gramnegativen Bakterien nicht m^5U -arm; die Biosynthese von Ribothymidin wird durch das Antibiotikum nicht gehemmt und ist demnach Folat unabhängig. Die geringe Methylierung in vitro ist auch in Hinweis dafür, daß m^5U in den tRNAs der gramnegativen Bakterien vorhanden ist. Fehlt m^5U in der tRNA, so kann es nachträglich mit SAM und *E. coli* Enzym (Wildtyp) eingeführt werden. In eine tRNA aus *E. coli* IB 5, der Ribothymidin vollständig fehlt, können 0,85 Methylgruppen mit dem *E. coli* Wildtypextrakt eingeführt werden. Geht man aus vom theoretisch möglichen Wert von einer Methylgruppe pro tRNA Molekül, so beträgt die Ausbeute 85 %. Die in vitro Methylierung verläuft nahezu quantitativ.

Tab. 4: Methylgruppenaufnahme von tRNAs aus Trimethoprim behandelten grampositiven Bakterien mit ^{14}C -SAM und Enzymextrakten aus *E. coli* MRE 600 (Wildtyp) und *E. coli* IB 5 ($m^5\text{U}$ -Mutante)

tRNA-Quelle	Mol CH_3 /Mol tRNA		$\frac{\text{Mol } m^5\text{U}}{\text{Mol tRNA}}$
	Wildtyp- enzym	Mutanten- enzym	berechnet
<i>B. brevis</i>	0,50	0,04	0,46
<i>B. circulans</i>	0,43	0,06	0,37
<i>B. coagulans</i>	0,48	0,04	0,44
<i>B. licheniformis</i>	0,47	0,03	0,44
<i>B. macernas</i>	0,58	0,04	0,54
<i>B. pumilis</i>	0,50	0,04	0,46
<i>B. megaterium</i>	0,24	0,05	0,19
<i>B. subtilis</i>	0,45	0,06	0,39
<i>B. stearothermophilus</i>	0,02	0,02	-
<i>A. albidus</i>	0,21	0,06	0,15
<i>C. bovis</i>	0,27	0,03	0,24
<i>M. lysodeikticus</i>	0,63	0,07	0,56
<i>M. varians</i>	0,40	0,05	0,35
<i>S. aureus</i>	0,40	0,07	0,33
<i>S. faecium</i>	0,50	0,07	0,43

Die Differenz der erhaltenen Werte entspricht der Methylierung von U zu $m^5\text{U}$. Ein Mol $^{14}\text{CH}_3$ -Gruppen pro Mol tRNA entspricht 29.000 cpm. Zur Kontrolle wurde die Methylgruppenaufnahme in $m^5\text{U}$ -defizienter tRNA mit Wildtypenzym gemessen. Im Durchschnitt wurden 0,85 Methylgruppen pro Mol tRNA eingeführt. Weitere Einzelheiten unter den in Material und Methoden beschriebenen experimentellen Bedingungen.

Tab. 5: Methylgruppenaufnahme von tRNAs aus Trimethoprim behandelten gramnegativen Bakterien mit ^{14}C -SAM und Enzymextrakten aus *E. coli* (Wildtyp und m^5U -Mutante)

tRNA	Mol CH_3 /Mol tRNA	
	Wildtyp- enzym	Mutanten- enzym
<i>E. coli</i> MRE 600	0,01	0,01
<i>P. aeruginosa</i>	0,02	0,02
<i>R. lupini</i>	0,03	0,03
<i>S. marcescens</i>	0,03	0,03
<i>S. typhimurium</i>	0,04	0,04
<i>X. pruni</i>	0,01	0,01

Zur Kontrolle wurden einige tRNAs aus unbehandelten grampositiven Stämmen mit SAM und beiden Enzymextrakten methyliert. Mit Ausnahme von *M. lysodeikticus* tRNA nehmen diese tRNAs mit dem Wildtypextrakt keine zusätzlichen Methylgruppen auf (Tab. 6), was dafür spricht, daß die tRNAs bezüglich m^5U voll methyliert sind. *M. lysodeikticus* tRNA enthält dagegen weniger Ribothymidin als die tRNAs der anderen grampositiven Bakterien. Deshalb kann die tRNA aus *M. lysodeikticus* mit *E. coli* Wildtypextrakt zu einem höheren Ausmaß methyliert werden. Die geringe Methylierung der tRNAs mit dem Mutantenenzym ist auf andere Basenmethylierungen zurückzuführen, die durch den heterologen Enzymextrakt katalysiert werden.

Transfer RNAs aus Trimethoprim behandelten grampositiven Bakterien nehmen weniger als 0,85 Methylgruppen pro tRNA Molekül auf. Für die geringere in vitro Bildung von Ribothymidin können verschiedene Ursachen verantwortlich sein:

- (i) Die Gesamt-tRNAs aus Trimethoprim behandelten Zellen sind heterogen hinsichtlich ihres Gehalts an m^5U , weil vollständig modifizierte tRNAs vor der Behandlung mit dem Antibiotikum, aber m^5U -arme tRNAs erst nach Trimethoprimgabe gebildet werden.

Tab. 6: Heterologe Methylierung von tRNAs aus unbehandelten grampositiven Bakterien mit ^{14}C -SAM und Enzymextrakten aus *E. coli* (Wildtyp und m^5U^- -Mutante)

tRNA	Mol CH_3 /Mol tRNA	
	Wildtyp- enzym	Mutanten- enzym
<i>A. albidus</i>	0,06	0,06
<i>B. brevis</i>	0,05	0,04
<i>B. coagulans</i>	0,05	0,05
<i>B. licheniformis</i>	0,04	0,05
<i>B. subtilis</i>	0,06	0,06
<i>C. bovis</i>	0,04	0,03
<i>M. lysodeikticus</i>	0,37	0,07
<i>S. aureus</i>	0,06	0,07

- (ii) Nicht in allen Fällen konnte das Wachstum der Bakterien durch Trimethoprim vollständig gehemmt werden (siehe Tab. 2). Selbst in den Fällen, bei denen eine vollständige Hemmung des Wachstums beobachtet wird, kann nicht mit Sicherheit auf eine totale Hemmung der Biosynthese von Ribothymidin geschlossen werden. Bei der Wachstums-
hemmung spielen pleiotrope Effekte eine Rolle (Mangel an Purinen, Pyrimidinen und Aminosäuren), die Synthese von m^5U wird dagegen nur durch den Mangel an Coenzym (THF-Derivat) beeinflusst.
- (iii) In vivo werden tRNAs zum Teil auf der Vorläufer-Stufe methyliert (Schäfer und Söll 1974). Es ist daher möglich, daß die in vitro Methylierung reifer tRNAs nicht optimal abläuft.
- (iv) Die Isolierung der tRNAs erfolgte nach einer für *B. subtilis* standardisierten Methode (siehe 2.6.1.). Geringfügige Verunreinigungen der tRNA-Präparationen aus anderen Mikroorganismen mit DNA und rRNA-Bruchstücken können nicht völlig ausgeschlossen werden.

3.2.4. Markierung von Ribothymidin durch Einbau von ^{14}C -Formiat in tRNAs

Wenn Ribothymidin in der tRNA vorkommt, jedoch nicht mit $^{14}\text{CH}_3$ -Methionin markiert wird, muß vermutet werden, daß ein Derivat der Tetrahydrofolsäure an der Biosynthese des Nukleotids beteiligt ist. Setzt man Kulturen von *B. subtilis* radioaktives Formiat zu, so wird Ribothymidin markiert, da Formiat eine Vorstufe des Tetrahydrofolsäurederivats ist. Der Einbau des radioaktiven Kohlenstoffs von Formiat wurde hier untersucht an tRNAs von *Corynebacterium bovis*, *Micrococcus lysodeikticus* und *Staphylococcus aureus* (Tab. 7). In jedem Fall wird eine radioaktive Markierung in m^5Up gefunden. Markiert sind jedoch auch Cp und Up, während eine Markierung der Purinnukleotide durch Zusatz von 10^{-5} M Adenosin und 10^{-5} M Guanosin unterdrückt werden konnte. Die markierten Kohlenstoffatome der Pyrimidine können von Formiat über CO_2 und Carbamylphosphat oder über Pyruvat in das Ringsystem eingebaut werden.

Die spezifische Aktivität von Up und m^5Up kann berechnet werden aus der gemessenen Radioaktivität und der optisch ermittelten Konzentration der Pyrimidinnukleotide. Vergleicht man die berechneten spezifischen Aktivitäten miteinander, so wird deutlich, daß m^5Up ca. 10-20 mal besser markiert ist als Up. Damit ist gezeigt, daß Formiat eine Vorstufe der Synthese von Ribothymidin in den drei untersuchten Bakterienstämmen ist.

Tab. 7: Einbau von ^{14}C -Formiat in tRNA von *C. bovis*, *M. lysodeikticus* und *S. aureus* - Analyse der markierten Nukleotide

Stamm	cpm		Spez. Akt. (cpm/nmol)	
	Up	m^5Up	Up	m^5Up
<i>C. bovis</i>	268	601	6	116
<i>M. lysodeikticus</i>	533	679	11	166
<i>S. aureus</i>	756	369	12	131

3.3. Modifizierte Basen in rRNA von *B. subtilis* und *M. lysodeikticus**

Ribosomale Ribonukleinsäuren sind Bestandteil der Ribosomen bei Prokaryoten und Eukaryoten und erfüllen eine wichtige Funktion in der Proteinbiosynthese (Nomura 1973). Die rRNA wird in der Regel durch ihren Sedimentationskoeffizienten definiert, z.B. 16S und 23S für die prokaryotischen rRNA-Arten. Die Methylierung von 16S und 23S rRNA wurde in den letzten Jahren eingehend an *E. coli* Ribosomen untersucht (Hayashi et al. 1966, Dubin und Günalp 1967, Fellner 1969). Dabei zeigte sich, daß die rRNA neben 1-Methylguanosin, 2-Methylguanosin, 7-Methylguanosin, 2-Methyladenosin und 6-Methyladenosin auch methylierte Nukleoside enthält, die nicht in prokaryotischen tRNAs vorkommen, wie 5-Methylcytosin und N⁶-Dimethyladenosin. Weitherhin wurde in *E. coli* rRNA auch Ribothymidin gefunden. Über die methylierten Basen der rRNA grampositiver Bakterien ist dagegen wenig bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die rRNAs aus *B. subtilis* und *M. lysodeikticus** auf ihren Gehalt an methylierten Basen untersucht und mit rRNA von *E. coli* verglichen. Es sollte vor allem geklärt werden, ob Ribothymidin in den rRNAs grampositiver Bakterien vorkommt und ob, wie in der tRNA dieser Organismen, ein Derivat der Tetrahydrofolsäure an der Biosynthese dieses Nukleosids beteiligt ist.

3.3.1. Methylgruppengehalt der rRNA

Für die Untersuchungen wurden methionin-auxotrophe Stämme von *E. coli* ($\text{met}^- \text{rel}^-$) und *B. subtilis* ($\text{met}^- \text{rel}^-$) verwendet. Von *M. lysodeikticus* stand keine methionin-auxotrophe Mutante zur Verfügung. Der Defekt in der Biosynthese der Aminosäure Methionin bedeutet, daß die Mutanten nur wachsen können, wenn Methionin dem Medium zugesetzt wird. Ein Vorteil, Markierungsexperimente mit solchen Mutanten durchzuführen, liegt darin, daß die spezifische Aktivität des radioaktiven Methionins nicht durch zell-

eigene Methioninsynthese verdünnt wird. Diese Bedingung sollte erfüllt sein, um den Methylgruppengehalt von RNA mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten und des Molekulargewichts zu berechnen (Kurland 1960). In methionin-prototrophen Stämmen ist die Bestimmung des Methylgruppengehalts nur dann einigermaßen zuverlässig, wenn genügend Methionin dem Medium zugesetzt wird. Die zelleigene Methioninsynthese wird dann abgeschaltet und das radioaktiv markierte Methionin aus dem Medium aufgenommen, wobei die spezifische Radioaktivität nicht verändert wird.

Die rRNAs von *E. coli*, *B. subtilis* und *M. lysodeikticus** wurden über RPC-5-Säulen getrennt. Die Trennung ist am Beispiel von *B. subtilis* rRNA in Abb. 8 dargestellt. Die 16S rRNA wird mit einer Kochsalzkonzentration von 0,8-0,9 M abgelöst, die 23S rRNA wird mit 1,1-1,2 M NaCl von der Säule eluiert. Die Fraktionen, die 16S und 23S rRNA enthalten, wurden getrennt gesammelt und wie in 2.7.1. beschrieben aufgearbeitet.

Der Methylgruppengehalt der rRNAs von *E. coli*, *B. subtilis* und "*M. lysodeikticus*" wurde in jeweils drei unabhängigen Experimenten ermittelt. *E. coli* 16S rRNA enthält im Durchschnitt 13 Methylgruppen. Dieser Wert liegt deutlich unter dem von Fellner (1969) mit $^{14}\text{C}/^{32}\text{P}$ Doppelmarkierung errechneten Wert von 19 Methylgruppen. Sequenzanalysen der 16S rRNA von *E. coli* (Ehresmann et al. 1975) zeigen jedoch, daß die 12-13 Methylgruppen auf 9-10 methylierte Nukleotide verteilt sind. In 16S rRNA von *B. subtilis* und *M. lysodeikticus** wurden durchschnittlich 8 Methylgruppen gefunden.

Tab. 8: Methylgruppengehalt von 16S und 23S rRNA aus
E. coli, *B. subtilis* und *M. lysodeikticus**

	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. lysodeik.</i> *
16S rRNA	13 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1
23S rRNA	18 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1

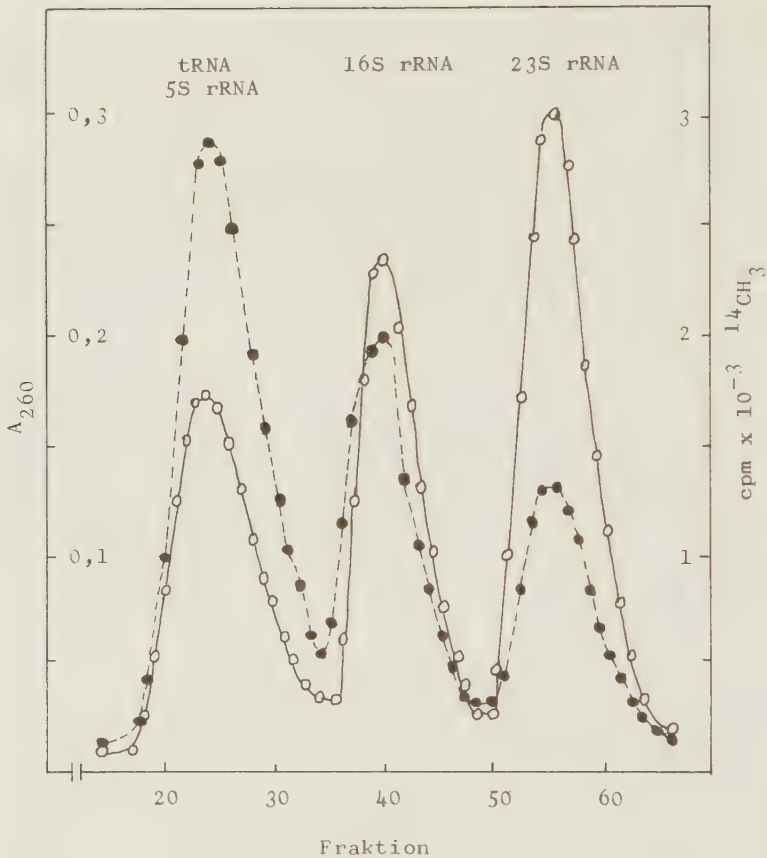


Abb. 8: RPC-5 Profil von Ribonukleinsäuren aus *B. subtilis*

15 OD des radioaktiv markierten Nukleinsäureextraktes wurden auf die Säule (34 x 0,9 cm) aufgetragen. Die Ribonukleinsäuren wurden mit 150 ml eines NaCl-Gradienten (0,4 M bis 1,5 M) eluiert. Die Radioaktivität und die optische Dichte wurden in den einzelnen Fraktionen bestimmt.

○—○ A_{260} ●---● Radioaktivität $^{14}CH_3$

Die 23S rRNA von *E. coli* enthält 18 Methylgruppen. Auch in diesem Fall liegt der von Fellner (1969) ermittelte Gehalt wesentlich höher, nämlich bei 29 Methylgruppen pro 23S rRNA Molekül. Die Nukleotidsequenz der 23S rRNA wurde bisher nur partiell aufgeklärt (Branlant et al. 1975). Über die Positionen der methylierten Nukleotide gibt es bisher noch keine experimentellen Hinweise.

Auffällig ist der geringe Methylgruppengehalt der 23S rRNA der grampositiven Bakterien mit 8 bzw. 7 Methylgruppen. Man muß daher vermuten, daß bestimmte methylierte Basen, die in der 23S rRNA von *E. coli* vorkommen, in der großen ribosomalen RNA von *B. subtilis* und *M. lysodeikticus** zu fehlen.

3.3.2. Methylierte Basen der 16S rRNA

Die methylierten Basen der 16S rRNA aller drei Mikroorganismen wurden nach Perchlorsäurehydrolyse durch zweidimensionale Dünnschichtchromatografie charakterisiert. Die Muster der $^{14}\text{CH}_3$ -markierten Basen sind in Abb. 9 gezeigt. Die methylierten Basen, die am häufigsten in der 16S rRNA vorkommen, sind 2-Methylguanin, methylierte Cytosine (m^5C und vermutlich m^4C) sowie 6-Dimethyladenin. Weiterhin werden 7-Methylguanin, 3-Methyluracil, 5-Methyluracil und 6-Methyladenin gefunden. Da m^6A in der 16S rRNA von *E. coli* nicht vorkommt (Fellner 1969), scheint die 16S rRNA in diesem Fall mit 23S rRNA (oder Bruchstücken der 23S rRNA) verunreinigt zu sein. Ebenso muß angenommen werden, daß m^5U in der 16S rRNA von *B. subtilis* nicht vorkommt und auf eine geringe Verunreinigung mit 23S rRNA zurückzuführen ist.

Qualitativ unterscheiden sich die Muster der methylierten Basen der 16S rRNA aus den drei Mikroorganismen kaum. Zieht man die unterschiedlichen Gehalte an Methylgruppen in Betracht und setzt diese für die 16S rRNA eines jeden Bakteriums gleich 100%, so kann die Häufigkeit einer methylierten Base pro 16S rRNA Molekül angegeben werden. Das Ergebnis dieser Auswertung ist in Tab. 9 aufgeführt. Die Anzahl der einzelnen methylierten Basen der 16S rRNA von *E. coli* stimmt mit Sequenzdaten gut überein.



a)



b)



c)

3. Dim. Fließmittel B



4. Dim. Fließmittel C

d)

1. Dim. Fließmittel A

Abb. 9: Muster der methylierten Basen der 16S rRNA verschiedener Mikroorganismen nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatografie

- a) *E. coli*
- b) *B. subtilis*
- c) *M. lysodeikticus**
- d) schematische Zeichnung der Lage der verschiedenen Basen

1 = m⁷G 2 = m²G 3 = mC 4 = m⁶A 5 = m⁶₂A 6 = m⁵U
7 = m³U

Die 16S rRNAs von *B. subtilis* und *M. lysodeikticus** enthalten weniger 2-Methylguanin und weniger methylierte Cytosine.

Tab. 9: Relative Mengen der methylierten Basen in 16S rRNA von *E. coli*, *B. subtilis* und *M. lysodeikticus**

Verbindung	Prozent der Gesamtradioaktivität in Methylgruppen		
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. lysod.</i> *
m ⁵ U	4,6 (1)	2,5 a)	-
m ³ U	4,8 (1)	7,2 (1)	8,0 (1)
m ⁷ G	7,3 (1)	10,8 (1)	13,6 (1)
m ² G	26,3 (4)	21,2 (2)	23,2 (2)
m ⁶ A	4,8 a)	-	-
m ⁶ ₂ A	23,1 (2)	33,9 (2)	35,1 (2)
mC	26,6 (4)	21,2 (2)	20,1 (2)

a) Verunreinigung mit 23S rRNA oder 23S rRNA-Bruchstücken

Die Zahlen in Klammern geben die Häufigkeit der Base pro 16S rRNA Molekül an.

3.3.3. Methylierte Basen der 23S rRNA

Das Muster der methylierten Basen der 23S rRNA von *E. coli*, *B. subtilis* und *M. lysodeikticus* ist in Abb. 10 dargestellt. Im Gegensatz zum Muster der 16S rRNA weisen die Muster der methylierten Basen der 23S rRNAs zwischen *E. coli* einerseits und *B. subtilis*/*M. lysodeikticus* andererseits erhebliche Unterschiede auf. Die quantitative Auswertung der Analysen macht diese Unterschiede besonders deutlich (Tab. 10).

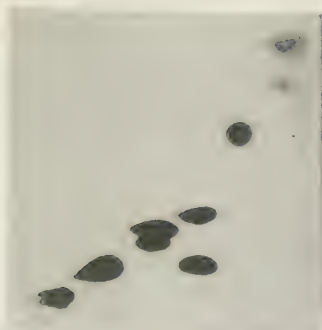
Tab. 10: Relative Mengen der methylierten Basen in 23S rRNA von *E. coli*, *B. subtilis* und *M. lysodeikticus*

Verbindung	Prozent der Gesamtradioaktivität in Methylgruppen		
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. lysod.*</i>
m ⁵ U	8,3 (2)	38,7 (4)	28,1 (2)
m ³ U	-	1,8 a)	-
m ¹ G	8,0 (2)	-	-
m ⁷ G	9,0 (2)	16,7 (2)	25,9 (2)
m ² G	21,6 (4)	19,2 (2)	23,4 (2)
m ² A	8,1 (2)	5,4 (0,5)	12,3 (1)
m ⁰ A	17,1 (4)	-	-
m ⁶ ₂ A	7,5 a)	9,8 a)	5,5 a)
mC	18,4 (4)	6,0 (0,5)	3,1 a)

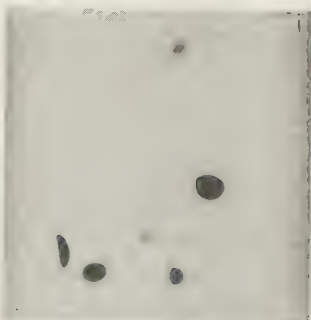
a) Verunreinigung mit 16S rRNA

Die Zahlen in Klammern geben die Häufigkeit der Base pro 23S rRNA Molekül an.

Die Base 5-Methyluracil macht in der 23S rRNA von *E. coli* 8 %, in *B. subtilis* fast 40 % und in *M. lysodeikticus** 28 % aller methylierten Basen aus. In Häufigkeit pro 23S rRNA angegeben enthält *B. subtilis* vier 5-Methyluracile.



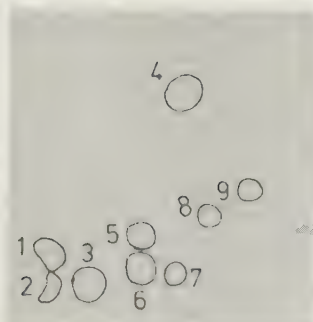
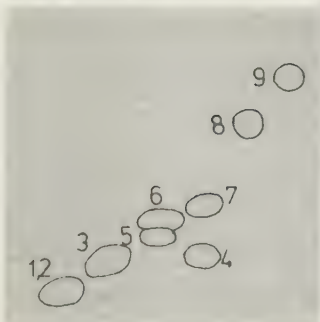
a)



b)



c)



d)

2. Dim. Fließmittel B

2. Dim. Fließmittel C

1. Dim. Fließmittel A

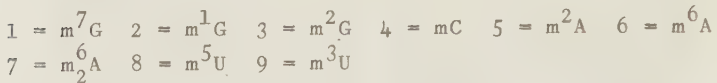
Abb. 10: Muster der methylierten Basen der 23S rRNA verschiedener Mikroorganismen nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatografie

a) *E. coli*

b) *B. subtilis*

c) *M. lysodeikticus**

d) schematische Zeichnung der Lage der verschiedenen Basen



E. coli und *M. lysodeikticus** 23S rRNA enthalten jedoch nur zwei 5-Methyluracile. Dem relativ hohen Anteil von m^5U an den methylierten Basen der 23S rRNA von *B. subtilis* steht ein sehr geringer Anteil von methylierten Cytosinen gegenüber. In der 23S rRNA von *M. lysodeikticus** scheinen die methylierten Cytosine ganz zu fehlen. Die Basen 1-Methylguanin und 6-Methyladenin, die beide in *E. coli* 23S rRNA vorkommen, fehlen in der 23S rRNA der grampositiven Bakterien völlig. Diemthyladenin wurde nur in der 16S rRNA nachgewiesen (Fellner 1969, Ehresmann et al. 1975) und muß als Verunreinigung angesehen werden.

3.3.4. Weitere Modifikationen der rRNA von *B. subtilis*

Die ribosomale RNA von *E. coli* enthält neben methylierten Nukleotiden auch Pseudouridin (Fellner 1969). Mit der 3H -Borhydrid-Methode konnte die Zusammensetzung der Hauptbasen und der Pseudouridin-Gehalt von 16S und 23S rRNA von *B. subtilis* ermittelt werden (Tab. 11).

Der GC-Gehalt der 16S rRNA von *B. subtilis* beträgt 56 %. Für die 16S rRNA von *E. coli* wurde ein GC-Gehalt von 55 % ermittelt (Ehresmann et al. 1975). Der GC-Gehalt der 23S rRNA von *B. subtilis* ist etwas erniedrigt und liegt bei 50 %.

Tab. 11: Nukleosidzusammensetzung und Pseudouridin-Gehalt von 16S und 23S rRNA aus *B. subtilis*

Verbindung	Molprozent	
	16S RNA	23S RNA
G	27,7	25,1
C	28,0	24,8
A	24,5	28,5
U	19,8	21,5
∅	0,25	0,16

Der Pseudouridin-Gehalt beträgt in 16S rRNA von *B. subtilis* 0,25 %, d.h. pro 1700 Nukleotide kommen vier Pseudouridine vor. In der 23S rRNA entfallen auf 3500 Nukleotide fünf Pseudouridine.

3.3.5. In vitro Methylierung der rRNA von *B. subtilis* mit *E. coli* Enzym

Im Gegensatz zur 23S rRNA von *E. coli* konnten die methylierten Basen m^1G und m^6A in der 23S rRNA von *B. subtilis* und "*M. lyso-deikticus*" nach Methioninmarkierung nicht nachgewiesen werden. Da die Methylgruppe von m^5U in der tRNA der grampositiven Bakterien nicht aus dem Methionin stammt, könnten m^1G und m^6A auch aus einer anderen Vorstufe als Methionin gebildet werden.

Die Analyse von rRNA mit der nachträglichen Markierung der Nukleoside mit 3H -Borhydrid erwies sich als ungeeignet. Die Schwierigkeiten bestehen darin, daß bei der rRNA das Verhältnis von Hauptnukleosiden zu methylierten Nukleosiden viel größer ist als bei der tRNA. Wenn das Verhältnis von Hauptnukleosiden zu modifizierten Nukleosiden größer als 50:1 ist, werden Flecken der modifizierten Nukleoside in der Regel von den Flecken der Hauptnukleoside auf dem Röntgenfilm verdeckt. Die modi-

fizierten Nukleoside lassen sich nicht mehr identifizieren (Chang 1975).

Wenn rRNA von *B. subtilis* methylierte Basen enthält, die nicht über SAM, sondern wie m^5U unter Vermittlung von Tetrahydrofolsäure synthetisiert werden, sollte Trimethoprim die Synthese dieser methylierten Basen hemmen. Mit *E. coli* Enzymextrakten sollte es dann möglich sein die fehlenden Methylgruppen in die rRNA von *B. subtilis* einzuführen.

Im Methylierungstest verhalten sich jedoch rRNA aus unbehandelten *B. subtilis* und rRNA aus Trimethoprim behandelten *B. subtilis* völlig gleich. In beiden Fällen wird ein schwacher Einbau von CH_3 -Gruppen (61 bzw. 63 pmol/OD rRNA) beobachtet.

Zur Methylierung wurden im Zuge weiterer Untersuchungen nur noch 16S RNA und 23S RNA aus unbehandelten *B. subtilis* eingesetzt. Die rRNAs wurden aus 50S und 30S Ribosomenuntereinheiten extrahiert. Die ribosomalen Untereinheiten wurden durch Sucrosegradientenzentrifugation getrennt (Abb. 11). Bei der Trennung treten in der Regel Kreuzkontaminationen von 50S Untereinheiten mit 30S Untereinheiten und umgekehrt auf.

In Abb. 12 ist die Kinetik der heterologen in vitro Methylierung von 16S rRNA und 23S rRNA aus *B. subtilis* mit ^{14}C -SAM und *E. coli* Enzymextrakt dargestellt. Die 23S rRNA hat nach zwei Std. etwa 10 mal mehr Methylgruppen aufgenommen als die 16S rRNA. Das Ausmaß der Methylierung von 23S rRNA entspricht 91 pmol/OD. Die schwache Methylierung der 16S rRNA könnte auf eine Verunreinigung mit 23S rRNA zurückzuführen sein.

Die Produkte der Methylierung von 23S rRNA wurden nach Säurehydrolyse und RNase T_2 Verdauung analysiert. Die Autoradiogramme (Abb. 13) weisen zwei radioaktive Flecken im Säurehydrolysat und drei Flecken im enzymatischen Hydrolysat auf. Auf Grund ihres chromatografischen Laufverhaltens konnten alle radioaktiven Flecken identifiziert werden. Aus Tab. 12 ist zu entnehmen, daß 1-Methylguanin und 6-Methyladenin sowohl nach

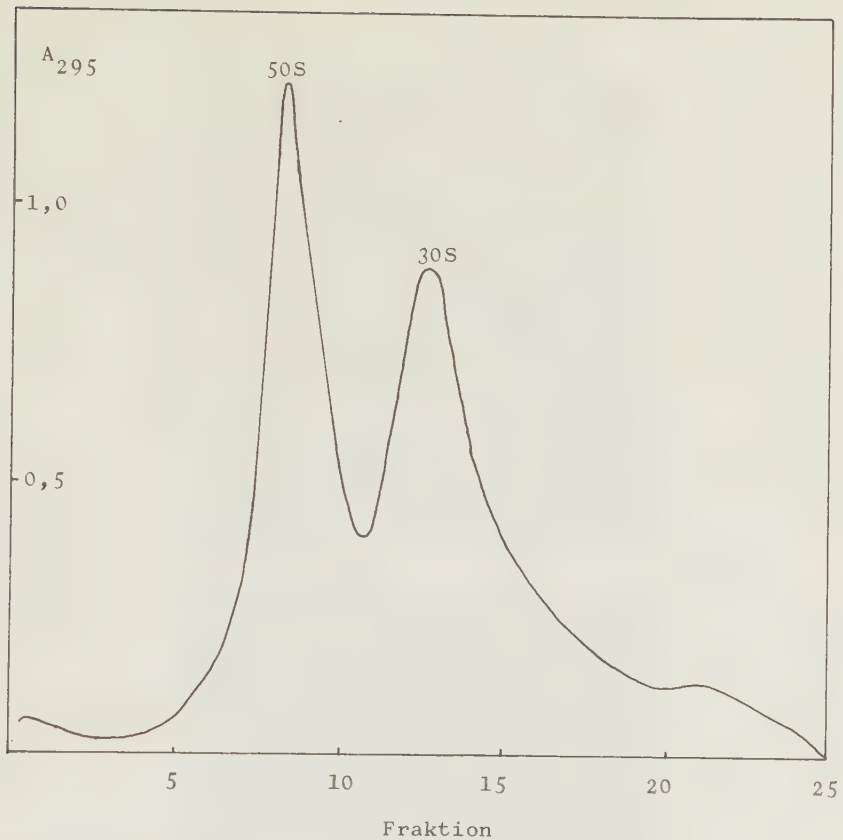


Abb. 11: Trennung von 50S und 30S Ribosomenuntereinheiten durch Gradientenzentrifugation

90 OD Ribosomen aus *B. subtilis* wurden auf einen 9-45%igen Saccharose-Gradienten aufgetragen und 14 Std. bei 129.000 x g (3 x 23 ml Ausschwingrotor) in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Gradient wurde vom Boden des Zentrifugenröhrchens aus in eine Durchflußküvette gepumpt und in Fraktionen gesammelt.

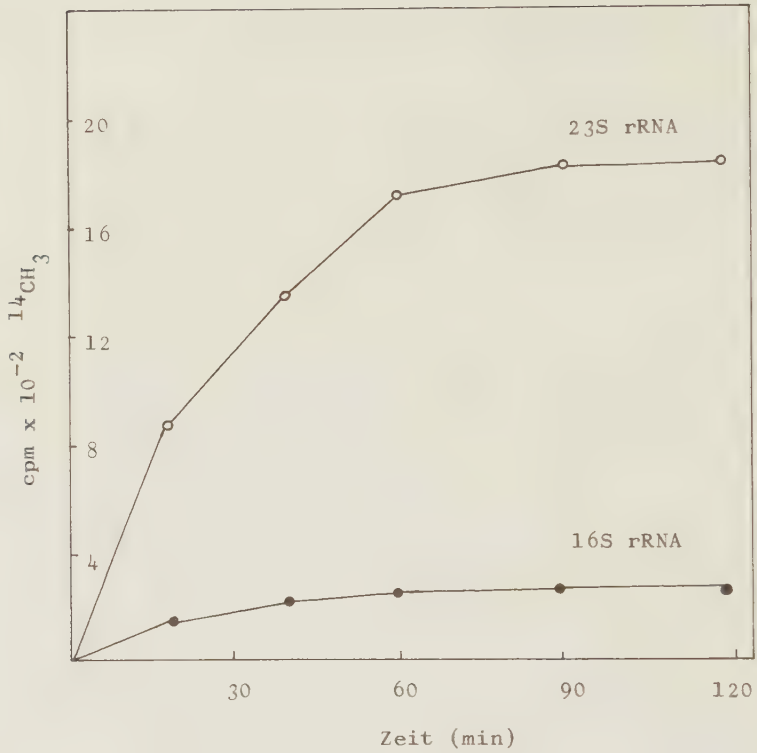


Abb. 12: Kinetik der heterologen Methylierung von 16S und 23S rRNA aus *B. subtilis* mit ¹⁴C-SAM und Enzymextrakten aus *E. coli* MRE 600

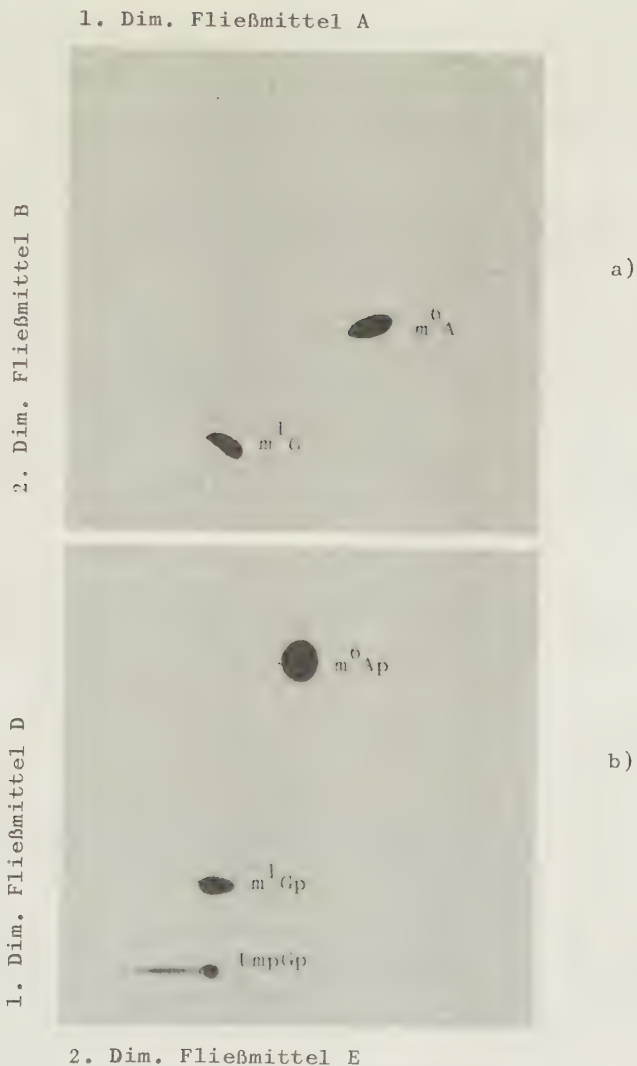


Abb. 13: Heterologe Methylierung von 23S rRNA aus *B. subtilis* mit ^{14}C -SAM und Enzymextrakt aus *E. coli*

a) Muster der methylierten Basen nach Säurehydrolyse

b) Muster der methylierten Nukleotide nach RNase T_2 -verdauung

Säurehydrolyse als auch nach T₂-Verdauung in ungefähr gleicher Menge gebildet werden. Der dritte Fleck im T₂-Hydrolysat ist ein Dinukleotid, das nach dem chromatografischen Laufverhalten mit UmpGp identisch ist (Hashimoto und Muramatsu 1975).

Tab. 12: Analyse der methylierten Produkte nach heterologer Methylierung von 23S rRNA aus *B. subtilis* mit ¹⁴C-SAM und Enzymextrakt aus *E. coli*

Verbindung	¹⁴ CH ₃ -Einbau in Prozent der Gesamtradioaktivität	
	Säurehydrolyse	T ₂ -Hydrolyse
m ¹ G	48,2	27,4
m ⁶ A	51,8	42,7
UmG	-	29,9

Diese Befunde zeigen, daß bestimmte methylierte Nukleoside in der rRNA von *B. subtilis* im Gegensatz zur rRNA von *E. coli* nicht vorkommen. Das Fehlen dieser Modifikationen muß auf die Abwesenheit der entsprechenden Enzymaktivitäten zurückgeführt werden. Da die 23S rRNA von *B. subtilis* mit *E. coli* Enzymextrakten spezifisch methyliert wird, muß angenommen werden, daß in *E. coli* 23S rRNA und *B. subtilis* 23S rRNA homologe Sequenzen vorliegen. Da die Behandlung mit Trimethoprim keine untermethylierte rRNA von *B. subtilis* erzeugt, werden alle methylierten Basen der rRNA von *B. subtilis* über S-Adenosylmethionin synthetisiert.

3.4. Charakterisierung der Base P in tRNA von *B. subtilis*

Nach Markierung von *B. subtilis* mit radioaktivem Methionin und nach folgender Basenanalyse der tRNA konnte in unserem Arbeitskreis (Domdey 1974) eine methylierte Base nachgewiesen werden, die mit keiner der bekannten methylierten Basen von *E. coli* tRNA identisch war. Diese unbekannte Base wurde insbesondere in tRNA aus Keimen der stationären Wachstumsphase gefunden. Da die Menge dieser Verbindung vom physiologischen Zustand der Zellen abhängig war, wurde diese nicht identifizier- te Base als "P" bezeichnet.

Im folgenden wurden

- (i) das chromatografische Laufverhalten von P in verschie- denen Fließmitteln
- (ii) das UV-Spektrum der angereicherten Base
- (iii) der Einbau radioaktiver Vorstufen in P
- (iv) sowie das Vorkommen in verschiedenen Bacillaceae und in unterschiedlichen Differenzierungszuständen in *B. subtilis*

untersucht.

3.4.1. Nachweis von P als Pyrimidinderivat

In weiteren Untersuchungen an *B. subtilis* tRNA konnte ausge- schlossen werden, daß die Base P ein Artefakt ist, der durch chemische Veränderung einer bekannten methylierten Base oder durch unvollständige Hydrolyse entsteht. Nach enzymatischer Hydrolyse von $^{14}\text{CH}_3$ -markierter tRNA mit RNase T₂ wurde in der zweidimensionalen Dünnschichtchromatografie ein markiertes Pro- dukt von allen anderen methylierten Nukleotiden abgetrennt. Der Nachweis, daß dieses Produkt das Nukleotid von P ist, konnte durch Hydrolyse mit Ameisensäure und einer nachfolgenden zwei- dimensional chromatografie (1. Dim. Fließmittel A, 2. Dim. Fließmittel B) erbracht werden. Das erhaltene Produkt zeigt das gleiche chromatografische Laufverhalten wie die Base P, die durch Perchlorsäurehydrolyse gewonnen wurde. Eine zusätzliche

Methylierung von Pp an der Ribose ist nicht vorhanden, da die gesamte Radioaktivität in Form der freien Base wiedergewonnen wurde.

Die Frage, ob P ein Pyrimidin- oder Purinderivat ist, kann durch Anwendung verschiedener Hydrolysemethoden gelöst werden. Die Spaltung von $^{14}\text{CH}_3$ -markierter tRNA mit RNase T_2 liefert das Mononukleotid von P, das zusammen mit Up als Marker (beide Verbindungen haben in Fließmittel E die gleiche Mobilität) isoliert werden kann. Je ein Teil des radioaktiven Nukleotids wurde mit 0,3 N Kalilauge, 1 N Salzsäure und 88 % Ameisensäure hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen und eindimensional mit Fließmittel E chromatografiert (Abb. 14). Die Radioaktivität wurde nach dem Auskratzen des Up-Markers bzw. Uracil-Markers bestimmt. Nach enzymatischer Verdauung, alkalischer Hydrolyse und HCl-Hydrolyse wurde die gesamte Radioaktivität im Up-Marker wiedergefunden. Mit Ameisensäure wurde die freie Base P erhalten, die im verwendeten Fließmittelsystem weiter als Pp wandert. Da die HCl-Hydrolyse Pyrimidinnukleotide und Purinbasen liefert (Markham und Smith 1952) muß das identische Produkt nach T_2 -Verdauung, alkalischer Hydrolyse und HCl-Hydrolyse ein Pyrimidinnukleotid sein.

3.4.2. Chromatografisches Laufverhalten

In Tab. 13 sind die R_F -Werte ^{a)} der Base P in drei Fließmitteln und die R_F -Werte des Nukleotids Pp in zwei Fließmitteln im Vergleich zu Uracil bzw. Uridinmonophosphat angegeben.

Auffällig ist die sehr ähnliche chromatografische Mobilität von P bzw. Pp zu U bzw. Up in allen Fließmittelsystemen. Die Einführung einer Methylgruppe in das Pyrimidin-Ringsystem hat in der Regel einen deutlichen Einfluß auf den R_F -Wert. 5-Methyluracil ($m^5\text{U}$) hat in Fließmittel A und Fließmittel B einen deutlich

$$a) \quad R_F = \frac{\text{Wanderungsstrecke Substanz (mm)}}{\text{Wanderungsstrecke Fließmittelfront (mm)}}$$

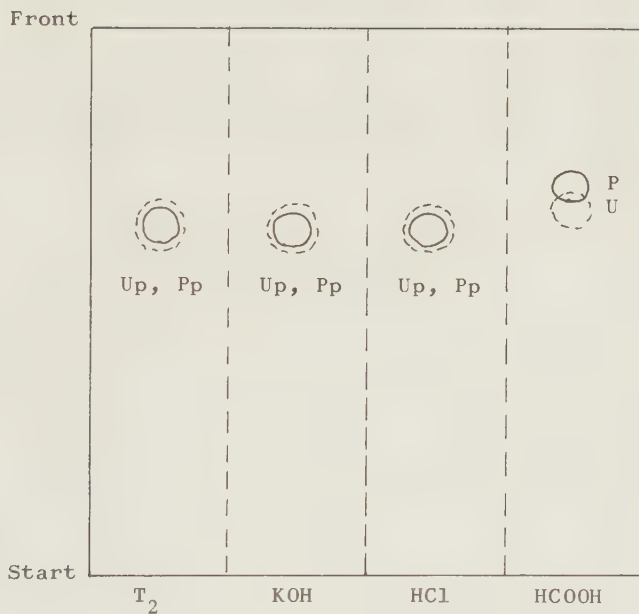


Abb. 14: Chromatografisches Laufverhalten von $^{14}\text{CH}_3\text{-Pp}$ in Fließmittel E nach Behandlung mit RNase T_2 , 0,3 N Kalilauge, 1 N Salzsäure und 88 % Ameisensäure
Weitere Erläuterungen siehe Text

höheren R_F -Wert als Uracil (U), ebenso m^5Up in Fließmittel E eine wesentlich größere Mobilität als Up. Rückschlüsse vom R_F -Wert einer Verbindung auf die mögliche Struktur durch Vergleich mit einer bekannten Substanz sind nur sehr begrenzt möglich. Das ähnliche chromatografische Laufverhalten von P und U bzw. Pp und Up läßt sich jedoch nur so interpretieren, daß neben einer apolaren Methylgruppe eine zweite, polare Gruppierung im Molekül vorhanden sein muß.

Tab. 13: Chromatografisches Laufverhalten von P als Base und 3'-Nukleotid in verschiedenen Fließmitteln auf Cellulose-Dünnschichtplatten

	R_F -Wert in Fließmittel				
	A	B	C	D	E
P	0,71	0,35	0,43		
U	0,68	0,39	0,51		
Pp				0,31	0,64
Up				0,31	0,64

3.4.3. Einbau radioaktiver Vorstufen

Das ähnliche chromatografische Verhalten von P und U läßt vermuten, daß es sich bei der unbekannten Base um ein Uracilderivat handelt. Die Markierung der Zellen mit radioaktivem Uridin ergab eine Markierung in der Position von P. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß P in den verwendeten Fließmittelsystemen mit anderen Uracilderivaten (z.B. Dihydrouridin und 4-Thiouridin), die beide in der tRNA von *B. subtilis* vorkommen, überlappt.

Die Markierung der Zellen mit ^{14}C -Adenin ergab keine Markierung in P, während andere Purinderivate (m^1A , m^2A und m^6A) markiert

wurden. Damit konnte das Ergebnis der HCl-Hydrolyse bestätigt werden.

In tRNAs von Prokaryoten und Eukaryoten wurden eine Reihe Schwefelderivate von Uridin gefunden (Hall 1971, Nishimura 1972). Ein Schwefelatom ersetzt ein Sauerstoffatom entweder in Stellung 2 oder Stellung 4 des heterozyklischen Ringsystems. Die Möglichkeit, daß die Base P Schwefel enthält, wurde durch Markierung von *B. subtilis* mit radioaktivem ^{35}S -Sulfat überprüft. Die Analyse der tRNA ergab, daß P und Pp nicht radioaktiv markiert wurden. Eine schwache Markierung von $s^4\text{U}$ und eines anderen, nicht identifizierten Nukleotids, war nachzuweisen.

3.4.4. Spektrum der angereicherte Base P

Die Markierung von P mit radioaktiven Vorstufen ($^{14}\text{CH}_3$ -Methionin, ^{14}C -Uridin) und das chromatografische Laufverhalten von P konnten in der Regel nur bestimmte Uracilderivate als Kandidaten ausschließen. Deshalb wurde versucht soviel unmarkiertes Material anzureichern, daß das UV-Spektrum gemessen werden konnte. Die Base P wurde durch zweidimensionale Papierchromatografie in Fließmittel A und Fließmittel B sowie Dünnschichtchromatografie in Fließmittel B weitgehend von anderen Basen abgetrennt. Das UV-Spektrum dieser angereicherten Fraktion und von Uracil als Vergleich wurde in 0,1 N HCl aufgenommen (Abb. 15). Das Absorptionsmaximum der angereicherten P-Fraktion liegt bei 263 nm, das Minimum bei 241 nm. Uracil weist ein Absorptionsmaximum bei 257 nm und ein Minimum bei 234 nm auf. Diese Verschiebung der Absorptionsmaxima und -minima tritt auch bei $m^5\text{U}$ und 5-Carboxymethyluridin auf (Hall 1971).

Die Struktur dieser methylierten Base konnte auf Grund der hier vorgelegten Befunde mit spektroskopischen Methoden (NMR-Spektrum, Massenspektrum) aufgeklärt werden (Albani, Schmidt, Kersten, Geibel und Lüderwald 1976).

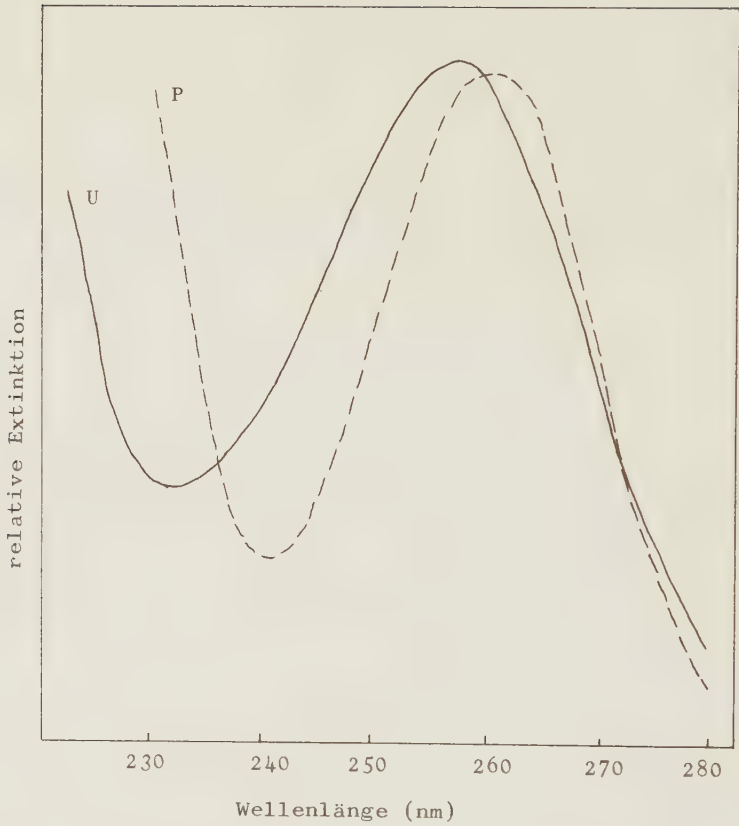


Abb. 15: Absorptionsspektrum von Uracil und einer angereicherten Fraktion der Base P in 0,01 N HCl

3.4.5. Ausbeute von P nach verschiedenen Hydrolysen

Im Gegensatz zu anderen methylierten Basen war die Ausbeute der Base P bei verschiedenen RNA-Präparationen relativ großen Schwankungen unterworfen. Es wurde deshalb genauer untersucht, inwieweit diese Schwankungen auf die Perchlorsäurehydrolyse zurückzuführen sind. Unterschiedliche Mengen radioaktiv markierter tRNA wurden mit Perchlorsäure eine oder zwei Std. bei 100°C hydrolysiert. Als Kontrollen wurden eine enzymatische Hydrolyse mit RNase T₂ und eine Hydrolyse mit Ameisensäure durchgeführt. Die genauen Hydrolysebedingungen und die Ausbeute an P bzw. Pp (enzymatische Hydrolyse) sind in Tab. 14 angegeben.

Tab. 14: Ausbeute von P nach verschiedenen Hydrolysen der tRNA

Hydrolysebedingungen	$\frac{\text{cpm (P)}}{\text{cpm (tRNA)}}$	% Ausbeute
3,5 OD tRNA in 50 µl Puffer (0,05 M NaAc, pH=4,5 1 Einheit T ₂) 12 Std. 37°C	0,153	100
44 OD tRNA in 200 µl 72% Perchlorsäure 1 Std. bei 100°C	0,047	31
17 OD tRNA in 200 µl 72% Perchlorsäure 1 Std. bei 100°C	0,062	40
3,5 OD tRNA in 200 µl 72% Perchlorsäure 1 Std. bei 100°C	0,158	103
17 OD tRNA in 200 µl 72% Perchlorsäure 1 Std. bei 100°C	0,117	76
3,5 OD tRNA in 200 µl 88% Ameisensäure 2 Std. bei 180°C	0,156	102

Die Ausbeute von Pp nach T₂-Hydrolyse wurde gleich 100 % gesetzt. Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, liefern Perchlorsäurehydrolyse, Ameisensäurehydrolyse und enzymatische Hydrolyse nahezu

identische Werte für die Ausbeute von P, wenn geringe Mengen tRNA (kleiner als 5 OD) hydrolysiert werden. Wird die RNA-Menge im Ansatz um den Faktor 5-12 erhöht, vermindert sich die Ausbeute von P nach Perchlorsäurehydrolyse um 60-70 %. Eine Verdopplung der Hydrolysezeit auf 2 Std. erhöht zwar die Ausbeute gegenüber der Hydrolysedauer von 1 Std., ermöglicht aber dennoch keine vollständige Freisetzung von P. Die geringere Ausbeute von P unter bestimmten Hydrolysebedingungen muß in erster Linie auf unvollständige Hydrolyse zurückgeführt werden. Eine generelle Säurelabilität der Base P scheint dagegen nicht zu bestehen.

3.4.5. Vorkommen von P in verschiedenen Wachstumsphasen

Die relative Menge der Base P in der logarithmischen Wachstumsphase ($A_{578}=0,4$) und der stationären Phase ($A_{578}=1,9$) wurde mit der enzymatischen Hydrolysemethode, welche die reproduzierbarsten Werte liefert, ermittelt. In der logarithmischen Phase macht Pp 8,5 % aller methylierten Nukleotide aus, während in der stationären Phase der Gehalt auf 17,5 % ansteigt. Die Befunde von Domdey (1974), der den Gehalt von P nach Perchlorsäurehydrolyse ermittelte, konnten damit bestätigt werden.

Die geringere Menge der Base P in *B. subtilis* Zellen, die logarithmisch wachsen, könnte bedeuten, daß P ein Produkt ist, daß während der Sporulation in besonderem Maße gebildet wird. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden *B. subtilis* Zellen in Gegenwart von 75 mM Glucose mit radioaktivem Methionin markiert. Glucose reprimiert in dieser Konzentration die Sporenbildung in *B. subtilis* (Ohnè und Rutberg 1976).

Der Gehalt der tRNA an P war in Bakterien, deren Sporenbildung gehemmt war und in Kontrollkeimen, die mit der normalen Glucosemenge gewachsen waren, nahezu identisch (13,4 % bzw. 13,9 %). Damit kann ausgeschlossen werden, daß P als spezifische Modifikation in tRNAs von *B. subtilis* während der Sporulation auftritt.

3.4.6. Vorkommen der Base P in anderen grampositiven Bakterien

Das Vorkommen der Base P ist nicht nur auf die tRNA von *B. subtilis* beschränkt. Delk und Rabinowitz (1975) fanden nach Markierung von *S. faecalis* mit ^{14}C -Methionin ein Nukleotid in der tRNA, das auf Grund des chromatografischen Laufverhaltens mit Pp identisch sein sollte. Auch das unbekannte Pyrimidinnukleotid in *B. stearothermophilus* tRNA (Agris et al. 1973) könnte mit Pp identisch sein. In Abb. 16 sind die Muster der $^{14}\text{CH}_3$ -markierten Nukleotide der tRNA von *B. subtilis*, *B. brevis* und *B. coagulans* dargestellt. Die Analysen zeigen, daß Pp auch in der tRNA von *B. brevis* und *B. coagulans* vorkommt. Daneben wird in diesen grampositiven Bakterien auch m^1Ap gefunden. Die quantitative Zusammensetzung der methylierten Nukleotide in der tRNA dieser *Bacillus*-Arten unterscheidet sich kaum (Tab. 15). Die ribose-methylierten Nukleotide, die bei der Säurehydrolyse nicht erfaßt werden, machen in den hier untersuchten *Bacillaceae* rund 10 % der methylierten SAM-abhängigen Nukleotide aus.

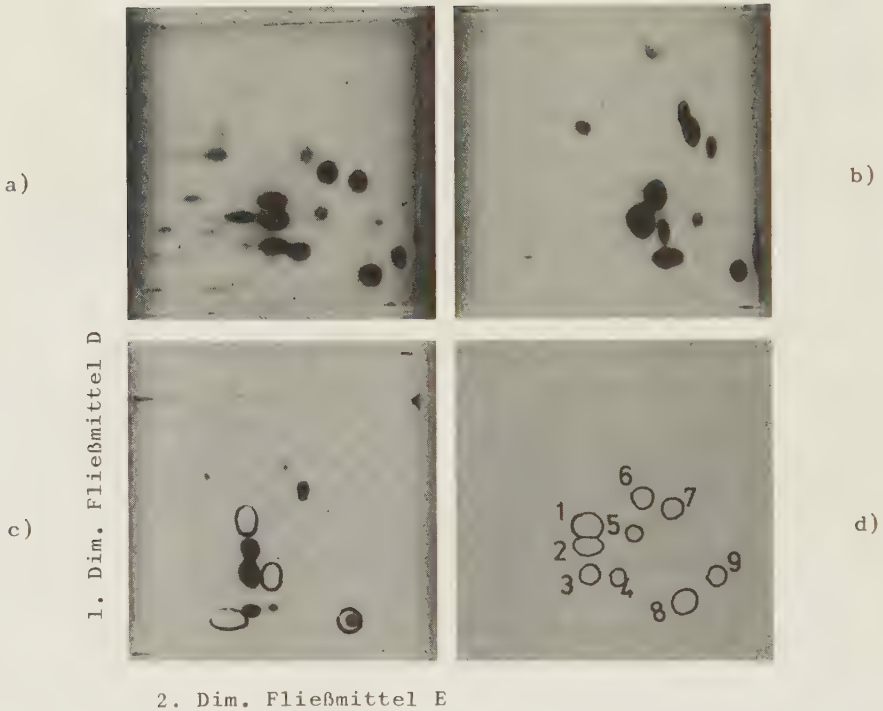


Abb. 16: Muster der $^{14}\text{CH}_3$ -markierten methylierten Nukleotide grampositiver Bakterien

a) *B. subtilis* tRNA

b) *B. brevis* tRNA

c) *B. coagulans* tRNA

d) schematische Zeichnung der Lage der verschiedenen Nukleotide

1 = m^1Ap 2 = m^7Gp 3 = m^1Gp 4 = m^2Gp 5 = m^5Cp

6 = m^6Ap 7 = m^2Ap 8 = Pp 9 = m^5Up

Die schwachen Flecken repräsentieren ribose-methylierte Dinukleotide

Tab. 15: Relative Mengen der SAM-abhängigen methylierten Nukleotide der tRNA von *B. subtilis*, *B. brevis* und *B. coagulans*

Verbindung	Prozent der Gesamtradioaktivität in Methylgruppen		
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. brevis</i>	<i>B. coagulans</i>
m ⁷ Gp	24,2	27,5	28,6
m ¹ Gp	7,6	7,8	7,8
m ² Gp	4,9	3,9	4,4
m ¹ Ap	12,8	14,4	16,9
m ² Ap	6,5	7,9	6,2
m ⁶ Ap	5,9	3,6	3,0
m ₂ ⁶ Ap a)	1,9	2,8	2,6
m ⁵ Cp a)	1,8	2,0	2,2
Pp	13,8	14,5	15,4
m ⁵ Up a)	3,7	-	-
ms ² i ⁶ Ap	2,6	2,7	-
2'-O-Methyl dinukleotide	11,5	9,4	9,4

a) Verunreinigung mit rRNA

3.5. Vorkommen von ms^2i^6A in *B. subtilis* tRNA

Eine spezifische Modifikation von tRNA aus *E. coli* ist 2-Thio-methyl-N⁶-isopentenyladenosin (ms^2i^6A). Der Biosyntheseweg des hypermodifizierten Nukleosids wurde vor kurzem in *E. coli* aufgeklärt (Geftter und Russel 1969, Agris et al. 1975). Das Nukleosid kommt in Nachbarstellung zum 3'-Ende des Anticodons solcher tRNAs vor, deren Anticodons mRNA codons erkennen, die mit U beginnen (Nishimura 1972). Ob das generell gilt, sollte für spezifische tRNAs von *B. subtilis* untersucht werden.

Einen indirekten Hinweis für das Vorkommen einer hydrophoben Base in tRNA^{Phe} und tRNA^{Tyr} von *B. subtilis* lieferte das chromatografische Verhalten dieser tRNAs an BD-Cellulose (Raettig, Schmidt, Mahal, Kersten und Arnold 1976) sowie die Reaktivität von tRNA^{Phe} und tRNA^{Tyr} gegenüber Permanganat (Raettig, Dissertation 1976). Die Basenanalyse der ¹⁴CH₃-markierten tRNA von *B. subtilis* lieferte ein Produkt, das auf Grund des chromatografischen Laufverhaltens ms^2i^6A ähnlich sein mußte, jedoch nicht identisch mit der hypermodifizierten Base sein konnte.

Zur Klärung dieser Frage wurde die tRNA von *B. subtilis* mit Perchlorsäure hydrolysiert und die freien Basen papierchromatografisch in zwei Dimensionen (Fließmittel A und Fließmittel B) aufgetrennt. Die Region, in der die Base X gewandert war, wurde ausgeschnitten, die angereicherte Verbindung mit 0,01 N Salzsäure eluiert und das UV-Spektrum aufgenommen.

In Abb. 17 sind die UV-Spektren von ms^2i^6A (das Nukleosid wurde uns freundlicherweise von Prof. Söll, Yale, USA zur Verfügung gestellt) und der isolierten Base X dargestellt. Charakteristisch für ms^2i^6A ist das zweigipfelige Spektrum mit Absorptionsmaxima bei 243 nm und 280 nm. Die angereicherte Base X, nicht identisch mit ms^2i^6A , zeigt ebenfalls diese beiden Absorptionsmaxima, wenn auch nicht so ausgeprägt. Aus dem Spektrum geht hervor, daß die Thiomethylgruppe, die charakteristisch für die Absorption zwischen 240 nm und 250 nm ist, in der Base X vorkommt. Es scheint nur die Isopentenylseitenkette verändert zu sein. Hall (1971) beschreibt,

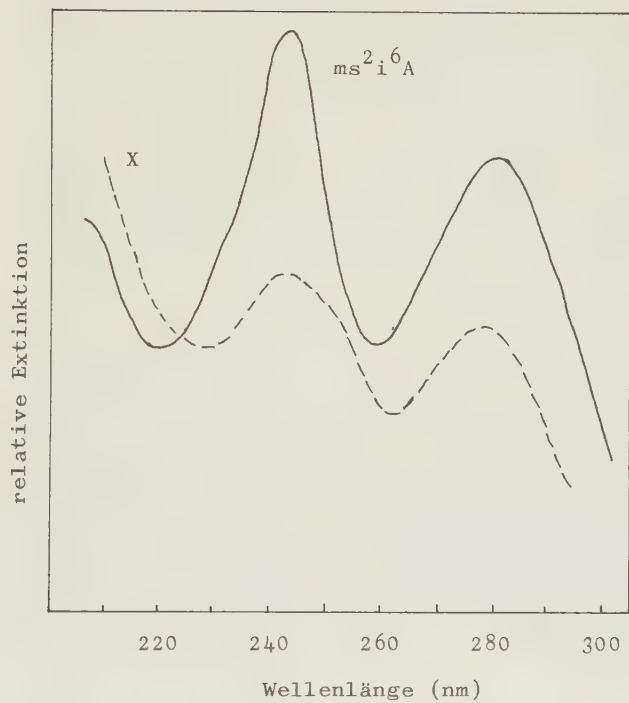


Abb. 17: Absorptionsspektrum von ms²i⁶A und einer angereicherten Fraktion der Base X in 0,01 N HCl

daß die Isopentenylseitenkette von i^6A im sauren Milieu Wasser an die Doppelbindung anlagert. Über eine weitere Reaktion wird das hydroxylierte Produkt umgelagert, wobei es zu einem Ring-schluß der Seitenkette mit dem N1-Atom des Adenins kommt. Wahrscheinlich handelt es sich bei der Base X um ein ms^2i^6A -Derivat mit einer Veränderung in der Seitenkette, die durch die Säurehydrolyse entsteht. Das Nukleosid ms^2i^6A konnte in der Zwischenzeit in der phenylalanin-spezifischen tRNA von *B. subtilis* nachgewiesen werden (Arnold, persönliche Mitteilung).

3.6. Nukleosidanalyse spezifischer tRNAs aus *B. subtilis*

In unserem Arbeitskreis wurden drei spezifische tRNAs aus *B. subtilis* isoliert. Von diesen tRNAs wurden Nukleosidanalysen durchgeführt.

Die 3H -markierten Nukleosidtrialkohole von $tRNA^{Met}_f$, $tRNA^{Phe}$ und $tRNA^{Tyr}$ sind in Abb. 18 dargestellt. Neben den vier Hauptnukleosiden enthalten die tRNAs auch modifizierte Nukleoside. Die quantitative Analyse der modifizierten Nukleoside (Tab. 16) zeigt, daß $tRNA^{Met}_f$ ein Pseudouridin, ein Dihydrouridin und ein Ribothymidin enthält. In $tRNA^{Phe}$ wurden ein 7-Methylguanosin, zwei Pseudouridine, zwei Dihydrouridine und ein Ribothymidin gefunden. Nach RNase T_2 Hydrolyse wurde ein Dinukleotid entdeckt, daß nach seinem chromatografischen Laufverhalten als GmpAp identifiziert wurde. Die tyrosin-spezifische tRNA enthält ein 1-Methyladenosin, zwei Pseudouridine, ein Dihydrouridin, ein Ribothymidin und ein nicht identifiziertes Produkt X_1 . Wahrscheinlich handelt es sich hier um ein Derivat von Q, einem hochmodifizierten Nukleosid, das von Keith et al. (1976) in der $tRNA^{Tyr}$ von *B. subtilis* nachgewiesen wurde. Sowohl $tRNA^{Phe}$ als auch $tRNA^{Tyr}$ enthalten ms^2i^6A . 4-Thiouridin kommt nur in $tRNA^{Tyr}$ vor.

Die $tRNA^{Tyr}$ von *B. subtilis* ist die erste spezifische tRNA von Prokaryoten, die m^1A enthält. Mit Ausnahme der $tRNA^{Phe}$ aus Kaninchenleber (Keith et al. 1973) besetzt m^1A die Position 19 vom 3'-OH-Ende aller eukaryotischen tRNAs, die dieses Nukleosid enthalten.

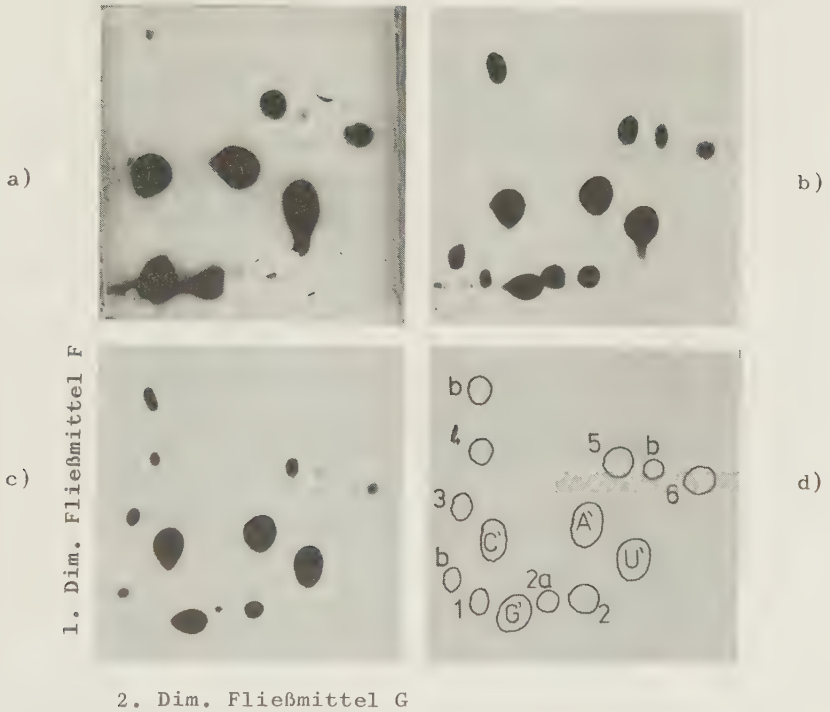


Abb. 18: Muster der ^3H -markierten Nukleosidtrialkohole nach zweidimensionaler Chromatografie

a) von tRNA^{Met}

b) von tRNA^{Phe}

c) von tRNA^{Tyr} aus *B. subtilis*

d) schematische Zeichnung der Lage der verschiedenen Nukleosidtrialkohole

1 = $m^7\text{G}$ 2 = U 2a = U-D 3 = $m^1\text{A}$ 4 = X_1

5 = hU 6 = $m^5\text{U}$ b = background spot

Tab. 16: Nukleosidanalyse von tRNA^{Met}_f, tRNA^{Phe} und tRNA^{Tyr} aus *B. subtilis*

Verbindung	Molprozent		
	tRNA ^{Met} _f	tRNA ^{Phe}	tRNA ^{Tyr}
G	24,4	28,1	26,6
C	33,0	30,0	32,7
A	19,1	17,7	18,0
U	18,7	16,1	10,1
m ⁷ G	-	0,87 (1)	-
ψ	1,29 (1)	2,16 (2)	1,86 (2)
m ¹ A	-	-	0,96 (1)
hU	1,21 (1)	1,73 (2)	1,28 (1)
m ⁵ U	1,22 (1)	1,14 (1)	1,18 (1)
X ₁ a)	-	-	0,67 (1)
Gm b)	-	(1)	-
s ⁴ U b)	-	-	(1)
ms ² i ⁰ A b)	-	(1)	(1)

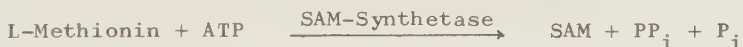
Die Zahlen in Klammern geben die Häufigkeit pro tRNA-Molekül an.

- a) Diese Verbindung ist wahrscheinlich identisch mit dem Trialkohol des Nukleosids Q
- b) das Vorkommen dieser Nukleoside wurde mit anderen Bestimmungsmethoden gezeigt (Raettig, Schmidt, Mahal, Kersten und Arnold 1976)

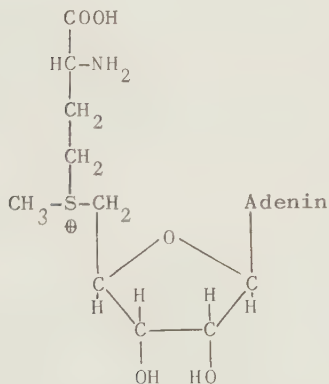
4. DISKUSSION

4.1. Biosynthese von Ribothymidin in grampositiven und gramnegativen Bakterien

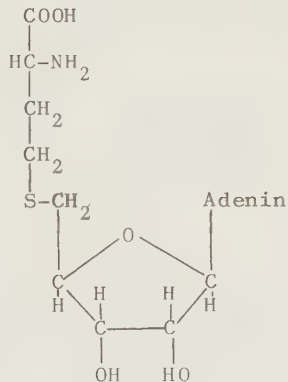
Lange Zeit wurde angenommen, daß alle Methylgruppen von modifizierten Nukleosiden in Transfer Ribonukleinsäuren von Methionin über S-Adenosylmethionin auf tRNA-Vorläufer durch spezifische Methyltransferasen übertragen werden (Kerr und Borek 1973). In vivo laufen hierbei folgende Reaktionen ab:



Die Methylsolfonium-Bindung von SAM ist energiereich und die Methylgruppe kann deshalb auf eine ganze Reihe von Methylgruppenakzeptoren (Ribonukleinsäuren, Aminosäuren, Proteine, Lipide) in Gegenwart der entsprechenden Enzyme übertragen werden, wobei S-Adenosylhomocystein freigesetzt wird.



S-Adenosylmethionin (SAM)



S-Adenosylhomocystein (SAH)

Die Methylierung von tRNAs ist sehr spezifisch und erfolgt nur an bestimmten Nukleosiden in einer ganz bestimmten Position innerhalb des tRNA-Moleküls (Baguley et al. 1970). Die Autoren vertreten die Ansicht, daß für die Erkennung der spezifischen tRNA-Methyltransferasen die Tertiärstruktur der Bereiche, die methyliert werden sollen, von ausschlaggebender Bedeutung ist.

In der Gesamt-tRNA von *B. subtilis* wird 5-Methyluracil, eine Base, die in der Gesamt-tRNA von *E. coli* fast fünfzig Prozent der methylierten Basen ausmacht, nicht mit Methionin markiert. Die fehlende CH_3 -Markierung kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden:

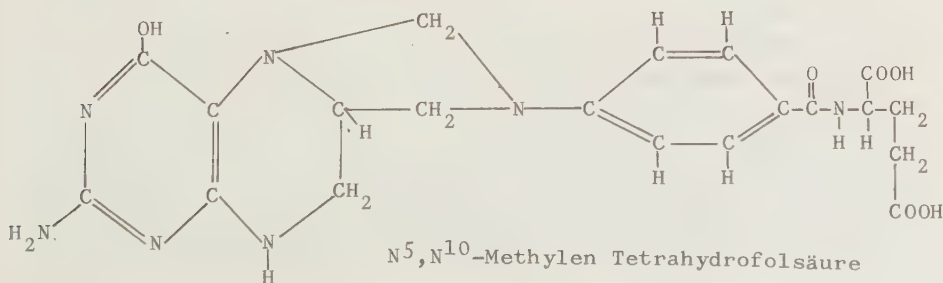
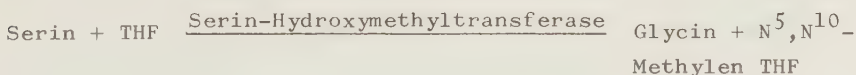
- (i) in *B. subtilis* kommt diese methylierte Base in der tRNA nicht vor
- (ii) in *B. subtilis* wird 5-Methyluracil nicht über S-Adenosylmethionin synthetisiert. Die Methylgruppe muß dann aber von einem anderen Donor bereitgestellt werden.

Zum Nachweis von Ribothymidin (m^5U) in der tRNA von *B. subtilis* können verschiedene Bestimmungsmethoden (Markierung der Zellen mit ^{14}C -Uracil oder ^{32}P -Phosphat, ^3H -Postlabeling und Messung der UV-Absorption) angewandt werden. Für quantitative Bestimmungen ist jedoch die von Randerath et al. (1971, 1972) entwickelte nachträgliche Tritium-Markierung mit Borhydrid den anderen Methoden überlegen. Für die Analyse der Nukleoside von Gesamt-tRNA aus einem Organismus genügen 2 OD der entsprechenden tRNA. Bei der Analyse einer spezifischen tRNA kommt man sogar mit einer Menge von 0,1 OD aus. Deshalb wurde auf dieses Verfahren der nachträglichen radioaktiven Markierung von Nukleosiden zurückgegriffen. Die Standardabweichungen für die Hauptnukleoside betrugen in den durchgeführten Experimenten 4-6 %. Für die modifizierten Nukleoside wurde eine Standardabweichung von 10-15 % ermittelt. Mit dieser Methode können allerdings nicht alle modifizierten Nukleoside bestimmt werden. An Ribose methylierte Nukleoside werden bei der Reaktion nicht umgesetzt. Ebenso kann der Gehalt an 4-Thiouridin nicht ermittelt werden. Modifizierte Nukleoside, die in der Gesamt-tRNA weniger als 0,1 Molprozent ausmachen, werden nicht erfaßt. Das ist auch der Grund dafür, daß die modifizierten Nukleoside der ribosomalen RNA nicht quantitativ be-

stimmt werden können.

Mit der nachträglichen ^3H -Markierung konnte gezeigt werden, daß die Gesamt-tRNA von *B. subtilis* ein Molprozent Ribothymidin enthält. Das bedeutet, daß nahezu alle spezifischen tRNAs diese modifizierte Base enthalten. Im Vergleich mit Gesamt-tRNA von *E. coli* ergaben sich hinsichtlich des Gehalts an Ribothymidin keine Unterschiede. Pseudouridin und Dihydrouridin kommen jedoch in *E. coli* tRNA häufiger vor. Für die tRNA von *M. lysodeikticus* wurde ein Ribothymidingehalt von 0,43 Molprozent ermittelt, was bedeutet, daß nicht alle tRNA-Spezies m^5U enthalten. Es muß deshalb angenommen werden, daß in *M. lysodeikticus* tRNAs vorhanden sind, die an Stelle von m^5U ein Uridin oder ein anderes Nukleosid enthalten. Die tRNA von *M. lysodeikticus* zeichnet sich auch durch einen geringeren Gehalt an Pseudouridin und Dihydrouridin aus. Dagegen kommt 1-Methyladenosin in der tRNA von *M. lysodeikticus* und der tRNA von *B. subtilis* in gleicher Häufigkeit vor.

Untersuchungen von Delk und Rabinowitz (1974) zeigen, daß in $\text{tRNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ von *Streptococcus faecalis* das Tetranukleotid $\text{GT}\psi\text{C}$ ersetzt ist durch $\text{GU}\psi\text{C}$, wenn die Bakterien in Abwesenheit von Folsäure wachsen. Folsäure und seine Derivate spielen bei der Übertragung von C_1 -Verbindungen eine wichtige Rolle. Die Folsäure selbst ist nicht als Coenzym aktiv, sondern nur die reduzierte Form, die als Tetrahydrofolsäure (THF) bezeichnet wird. Die Tetrahydrofolsäure ist der Akzeptor des β -Kohlenstoffatoms der Aminosäure Serin.



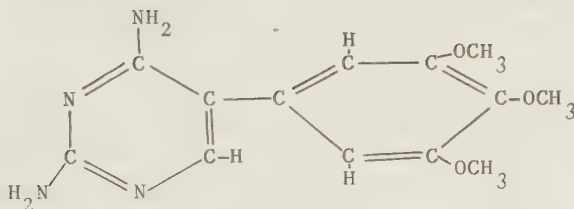
N^5, N^{10} -Methylen-Tetrahydrofolsäure ist ein Folsäurederivat, das Methylgruppen und Hydroxymethylgruppen auf Desoxyuridindiphosphat und Desoxycytidindiphosphat überträgt (Rader und Huennekens 1973).

Die Markierung von Ribothymidin mit radioaktivem Formiat und $L-(3-^{14}C)$ Serin als Vorstufen (Arnold, Schmidt und Kersten 1975) läßt den Schluß zu, daß ein Tetrahydrofolsäurederivat die Methylgruppe auf einen Uridinrest in der tRNA von *B. subtilis* überträgt. In weiteren Experimenten (Kersten, Sandig und Arnold 1975) wurde gezeigt, daß diese Methylierung in vitro auf der Stufe der Polynukleotide erfolgt. Als Methylgruppendonor konnte wie bei der Methylierung von Desoxyuridin zu Desoxythymidin N^5, N^{10} -Methylen Tetrahydrofolsäure dienen.

Die Methylierung von Uridin zu 5-Methyluridin in der tRNA von *B. subtilis* wird gehemmt, wenn Trimethoprim, ein kompetitiver Hemmstoff des Enzym Dihydrofolatreduktase, den wachsenden Bakterienkulturen zugesetzt wird (Arnold und Kersten 1975). Die isolierte tRNA ist arm an m^5U und kann mit *E. coli* Enzymextrakt und S-Adenosylmethionin in vitro nachmethyliert werden (Arnold, Schmidt, Raettig, Sandig, Domdey und Kersten 1976). Der Hemmstoff kann als Hilfsmittel zur Aufklärung der beiden verschiedenen Biosynthesewege (SAM-abhängig und THF-abhängig) in verschiedenen Organismen benutzt werden. Der beschriebene Suchtest ermöglicht eine schnelle, eindeutige Aussage über den Biosyntheseweg von Ribothymidin im jeweils untersuchten Organismus, wenn folgende Experimente durchgeführt werden:

- (i) Züchtung der Mikroorganismen mit und ohne Trimethoprim
- (ii) Isolierung der tRNA aus den behandelten und den unbehandelten Mikroorganismen
- (iii) Methylierung der tRNA aus Trimethoprim behandelten und unbehandelten Mikroorganismen mit ^{14}C -SAM und *E. coli* Enzymextrakten aus dem Wildtypstamm und der m^5U^- -Mutante.

Wird die tRNA aus dem mit Trimethoprim behandelten Mikroorganismus mit dem Wildtypextrakt, der die m^5U -spezifische tRNA-Methyltransferase enthält, wesentlich besser methyliert als mit dem



Trimethoprim = 2,4 Diamino, 5-(3,4,5 Trimethoxybenzyl)pyrimidin

Extrakt aus der Mutante, der das Enzym fehlt, so ist diese tRNA m⁵U-arm. Wird die tRNA aus den unbehandelten Zellen dann kaum methyliert oder wesentlich schlechter methyliert als die tRNA aus den behandelten Zellen, so kann gefolgert werden, daß Ribothymidin in dem untersuchten Organismus über ein Tetrahydrofolsäurederivat synthetisiert wird.

Von den 15 untersuchten grampositiven Bakterienstämmen wurde in 14 Stämmen eine Tetrahydrofolsäure-abhängige Synthese von Ribothymidin in der tRNA nachgewiesen. Nur *Bacillus stearothermophilus* macht eine Ausnahme. Ribothymidin wird in der tRNA dieses thermophilen Bakteriums mit S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonor gebildet (Agris et al. 1973). Warum gerade der thermophile *B. stearothermophilus* sich hinsichtlich der Biosynthese von m⁵U wie alle untersuchten gramnegativen Bakterienstämme verhält ist nicht bekannt. Ein anderes wärmeresistentes Bakterium, *Thermus thermophilus*, hat ein hypermodifiziertes Ribothymidin in der tRNA. An Stelle von Ribothymidin kommt 2-Thioribothymidin vor (Watanabe et al. 1974).

Die Funktion der modifizierten Basen in der tRNA ist noch weitgehend unbekannt. Nur in zwei Fällen konnte der Einfluß einer bestimmten Modifizierung auf die biologische Funktion der tRNA eindeutig aufgezeigt werden. In einem Fall ist die modifizierte Base neben dem 3'-Ende des Anticodons wichtig für die Bildung des tRNA-Ribosomenkomplexes (Nishimura 1972), im zweiten Fall konnte einer modifizierten tRNA eine regulatorische Funktion zu-

geordnet werden. Zwei Pseudouridinreste im Anticodonstamm einer tRNA^{His} von *Salmonella typhimurium* sind notwendig, um das Histidin-Operon zu reprimieren (Singer et al. 1972).

Die Sequenz GT Ψ C scheint durch Basenpaarung mit einer komplementären Sequenz in der 5S rRNA an der Komplexbildung tRNA/Ribosom beteiligt zu sein (Ofengand und Henes 1969, Richter et al. 1973). Die Wechselwirkung von tRNA mit dem Ribosom wird wahrscheinlich durch die Modifikationen T und Ψ erleichtert, da das Oligonukleotid T Ψ CG mit einer höheren Assoziationskonstanten an 5S rRNA gebunden wird als das unmodifizierte Oligonukleotid UUCG (Erdmann et al. 1973). Yang et al. (1973) vermuten, daß Ribothymidin in der Sequenz GT Ψ G für die Genauigkeit der Translation notwendig ist. Damit könnte geklärt werden, warum m⁵U-spezifische tRNA-Methyltransferasen sehr früh in der Evolution der tRNAs auftauchen und in fast allen tRNAs vorkommen. Björk und Neidhardt (1975) konnten zeigen, daß *E. coli* Stämme mit m⁵U in der tRNA einen evolutionären Vorteil gegenüber *E. coli* Stämmen ohne m⁵U haben. In Mischkulturen sind die m⁵U-Mutanten nicht überlebensfähig. Dagegen sind die Mutanten in einer Vielzahl untersuchter Eigenschaften wie Wachstumsrate, Regulation des Isoleucin-Valin- und Histidinoperons, Bildung des Initiationskomplexes und Proteinsyntheserate dem Wildtyp absolut ebenbürtig.

Warum haben sich in grampositiven und gramnegativen Bakterien unterschiedliche Biosynthesewege von Ribothymidin entwickelt? Mit Ausnahme der m⁵U-spezifischen Methylase arbeiten alle anderen Methyltransferasen grampositiver Bakterien mit S-Adenosylmethionin als Coenzym. Ein genereller Defekt, SAM zu verwerthen, ist in grampositiven Bakterien nicht vorhanden. Nicht unwahrscheinlich ist es, daß während der Evolution bestimmte Bakterien durch Mutation die Fähigkeit verloren haben Ribothymidin in der tRNA zu bilden, weil SAM als Coenzym nicht mehr von der m⁵U-spezifischen Methylase verwertet werden konnte. Der unter Umständen aufgetretene Nachteil gegenüber Bakterien mit Ribothymidin in der tRNA wurde dadurch wettgemacht, daß die Tetrahydrofolsäure-abhängige Synthese von Ribothymidin entwickelt wurde. Die SAM-abhängige Methylierung scheint phylogenetisch älter zu sein als die THF-abhängige Methylierung von Ribothymidin. Ver-

schiedene Mycoplasma-Arten, die als sehr primitive Bakterien gelten, haben kein m^5U in der tRNA. Andere methylierte Basen werden jedoch ausschließlich SAM-abhängig synthetisiert (Johnson et al. 1970, Klagsbrun 1973).

Im Gegensatz zur Biosynthese von Ribothymidin in der tRNA grampositiver Bakterien erfolgt die Methylierung von Desoxyuridin zu Desoxythymidin (Hauptbestandteil der DNA aller Organismen) auf der Stufe des Nukleosiddiphosphats (Rader und Huennekens 1973). In beiden Fällen wird Methylentetrahydrofolsäure als Coenzym verwendet. Man kann deshalb prüfen, ob sich die m^5U -spezifische tRNA-Methyltransferase der grampositiven Bakterien von der Thymidylatsynthetase ableitet. Die Isolierung und Charakterisierung der Tetrahydrofolsäure-abhängigen m^5U -Methylase aus grampositiven Bakterien wird über diese Frage Aufschluß geben können.

4.2. Modifizierte Nukleoside der rRNA von *B. subtilis*

Die Ribosomen aller Organismen enthalten drei RNA-Arten: zwei RNAs mit hohem Molekulargewicht, von denen die 16S RNA (Prokaryoten) bzw. 18S RNA (Eukaryoten) zur kleinen ribosomalen Untereinheit, die 23S RNA bzw. 28S RNA zur großen ribosomalen Untereinheit gehört, und eine RNA mit niedrigem Molekulargewicht, die 5S RNA, die mit der großen ribosomalen Untereinheit assoziiert ist. Aus tierischen Zellen wurde eine weitere niedermolekulare rRNA isoliert. Diese 6-7S RNA ist mit der 28S RNA durch Wasserstoffbrücken verbunden und wird durch Spaltung der 45S RNA-Vorstufe während des Reifungsprozesses gebildet (Attardi und Amaldi 1970).

Die niedermolekularen rRNAs enthalten keine (5S rRNA) oder nur sehr wenig methylierte Nukleoside (5,8S rRNA). In der 5S RNA des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae* wurden 0,5 Molprozent Pseudouridin, in der 5S RNA des Schleimpilzes *Blastocladiella emersonii* bis zu 1,3 Molprozent Pseudouridin gefunden (Attardi und Amaldi 1970).

Genauer untersucht hinsichtlich der modifizierten Nukleoside wurden die rRNAs von *Escherichia coli* (Hayashi et al. 1966, Dubin und Güralp 1967, Fellner 1969, Ehresmann et al. 1975), *Proteus vulgaris* (Fischel et al. 1975), *Bacillus subtilis* (Schmidt, Arnold und Kersten 1975), *Saccharomyces carlsbergensis* (Klootwijk und Planta 1973), Hela-Zellen (Maden und Salim 1974) sowie die ribosomalen RNAs aus Mitochondrien von Hamsterzellen (Dubin 1974). In rRNAs von Prokaryoten entfallen rund 90 % der Methylgruppen auf Basenmethylierungen, in Eukaryoten dagegen 80-90 % auf Ribosemethylierungen. Der Methylierungsgrad von Eukaryoten rRNA ist wesentlich höher als von rRNA aus Prokaryoten. Innerhalb der Eukaryoten nimmt der Methylgruppengehalt von den niederen zu den höheren Organisationstufen zu. Die mitochondrialen rRNAs sind methylgruppenarm und stehen damit den rRNAs der Prokaryoten nahe. Auch in der mitochondrialen rRNA dominiert die Basenmethylierung (Tab. 17).

Die 16S rRNA von *E. coli* enthält 13-14 Methylgruppen, die 16S rRNA von *B. subtilis* dagegen nur 8 Methylgruppen. Die entsprechende 17S rRNA von Hefe enthält bereits 24 Methylgruppen, die 18S rRNA aus Säugern fast die doppelte Anzahl, nämlich 46 Methylgruppen. Vergleicht man den Methylgruppengehalt der rRNA aus der großen ribosomalen Untereinheit der verschiedenen Organismen, so läßt sich die gleiche Tendenz wie bei der rRNA aus der kleinen Ribosomenuntereinheit feststellen. Die 23S rRNA von *B. subtilis* enthält 8-9 Methylgruppen, von *E. coli* 20-21 Methylgruppen. Auf die 26S rRNA von Hefe entfallen 43 Methylgruppen, auf die 28S rRNA von Hela-Zellen 70 Methylgruppen. Die 13S rRNA aus Mitochondrien von Hamsterzellen enthält 4 Methylgruppen, die größere 17S rRNA dagegen nur 2 Methylgruppen.

In *E. coli* rRNA werden 1-Methylguanin, 2-Methylguanin, 7-Methylguanin, 2-Methyladenin, 6-Methyladenin, 6-Dimethyladenin, methylierte Cytosine (m^5C und m^4C) sowie 3-Methyluracil und 5-Methyluracil gefunden (Tab. 17). *B. subtilis* rRNA enthält kein 1-Methylguanin und kein 6-Methyladenin, weiterhin weniger 2-Methylguanin, 2-Methyladenin und methylierte Cytosine. Der Gehalt an 5-Methyluracil ist jedoch höher als in *E. coli* rRNA. Die in *B. subtilis* rRNA fehlenden Methylierungen (m^1G und m^0A) können in vitro mit

Tab. 17: Vergleich der methylierten Nukleoside in rRNA aus Prokaryoten, Eukaryoten und Mitochondrien

Methylgruppen	E. coli a)		B. subtilis b)		S. carlsberg. c)		Hela-Zellen d)		Mitochondrien e)	
	16S	23S	16S	23S	17S	26S	18S	28S	Hamster 13S	17S
Methylgruppen	14	21	8	9	24	43	46	70	4	2
	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	4	2	2	-	-	-	-	-	-
	1	2	1	2	1	-	1	-	-	-
	-	-	-	-	-	2	1	1	-	-
	-	2	-	0-1	-	-	-	-	-	-
	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	3-4	-	4	-	4	-	2	-
	4	4	1-2	0-1	1	2	-	2	1	-
	0-1	-	1	-	-	2	-	-	-	1
	0-1	2	-	4	-	-	-	1	1	-
	-	1	-	-	18	37	40	66	-	1
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Am, Gm, Cm, Um	-	1	-	-	18	37	40	66	-	1

a) aus Fellner (1969) b) eigene Untersuchungen c) aus Klootwijk und Planta (1973)
d) aus Maden und Salim (1974) e) aus Dubin (1974)

E. coli Enzymextrakt in die 23S rRNA eingeführt werden. Diese heterologe Methylierung kann als Testsystem verwendet werden, um m^1G -spezifische und m^6A -spezifische rRNA-Methyltransferasen aus *E. coli* anzureichern. Das Fehlen von m^6A in der 23S rRNA von *B. subtilis* wird in der Arbeit von Tanaka und Weisblum (1975) bestätigt. Die Autoren konnten zeigen, daß m^6A nur in der 23S rRNA gramnegativer Bakterien (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) vorkommt. Der geringe Methylgruppengehalt der rRNAs grampositiver Bakterien und die unterschiedliche Zusammensetzung der methylierten Basen beweist, daß strukturelle Unterschiede zwischen den Ribosomen beider Bakterienklassen bestehen. Unterschiede wurden auch in den ribosomalen Proteinen gefunden (Loh 1973).

In der tRNA von *B. subtilis* wird Ribothymidin über ein Derivat der Tetrahydrofolsäure synthetisiert. In der rRNA kommt m^5U vor und wird SAM-abhängig gebildet, da das Nukleosid durch $^{14}CH_3$ -Methionin markiert wird. Dieser Befund unterstreicht die strenge Substratspezifität von Methyltransferasen. Das SAM-abhängige m^5U -spezifische rRNA methylierende Enzym kann Uridin in der tRNA nicht zu 5-Methyluridin methylieren.

In den letzten Jahren wurden die Oligonukleotide (die nach der Spaltung mit Ribonuklease T_1 auftreten) der 16S rRNA einer Reihe von Prokaryoten (*Enterobacteriaceae*, *Spirillaceae*, *Cyanophyta*, *Athirhodaceae*, *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae* und *Lactobacillaceae*) untersucht (Woese et al. 1975). Die Sequenzen der Oligonukleotide mit einer Kettenlänge größer als fünf Nukleotide wurden mit den Sequenzen der entsprechenden Oligonukleotide der 16S rRNA von *E. coli* verglichen. Dabei zeigte sich, daß vor allem Oligonukleotide in der 3'-Hälfte des RNA-Moleküls einen hohen Grad an homologen Sequenzen aufweisen. Aus den Sequenzdaten von Ehresmann et al. (1975) ist bekannt, daß 8 von insgesamt 13-14 Methylgruppen in einem Bereich von 150 Nukleotiden am 3'-Ende der 16S rRNA von *E. coli* auftreten ("Cluster"). Das Dinukleotid $m^6_2Ap-m^6_2Ap$ kommt in Position 24-25 vom 3'-Ende in einer ungepaarten Region der 16S rRNA vor und wird mit Ausnahme der 13S rRNA von Mitochondrien in allen rRNAs gefunden, die in

der kleinen ribosomalen Untereinheit integriert sind (siehe Tab. 17). Fehlt die Dimethylierung der beiden Adenosinreste, so sind *E. coli* Zellen resistent gegenüber dem Antibiotikum Kasugamycin (Helser et al. 1971). Werden Ribonukleoproteinpartikel (sog. "Cores") aus kasugamycin-resistenten Zellen *in vitro* methyliert, so werden die Ribosomen nach vollständiger Rekonstitution gegenüber dem Antibiotikum sensitiv (Helser et al. 1972). Thammana und Held (1974) konnten zeigen, daß für die Dimethylierung der beiden Adenosinreste *in vitro* mindestens acht Proteine (S₄, S₆, S₈, S₁₁, S₁₅, S₁₆, S₁₇ und S₁₈) an die 16S rRNA angelagert werden müssen. Werden bestimmte andere ribosomale Proteine (S₃, S₉, S₁₀ und S₁₄) zusätzlich in den Reaktionsansatz gebracht, findet die Methylierung nicht statt. Die Autoren schlossen daraus, daß die Dimethylierung der Adenosinreste *in vivo* während des Zusammenbaus der Ribosomen stattfindet. Den ähnlichen Schluß, daß die Dimethylierung der Adenosinreste ein relativ spätes Ereignis im Zusammenbau der Ribosomen von Eukaryoten darstellt, ziehen Maden und Salim (1974). Die Autoren können das methylierte Dinukleotid $m_2^6\text{Ap}-m_2^6\text{Ap}$ nur in reifer 18S rRNA nachweisen. Im 45 RNA-Vorläufer fehlt es.

4.3. Spezielle Nukleoside in tRNA grampositiver Bakterien

Die Nukleoside 1-Methyladenosin und P wurden in den bisher untersuchten gramnegativen Bakterien nicht gefunden. 1-Methyladenosin kommt in der Gesamt-tRNA vieler grampositiver Bakterien vor. In eukaryotischen tRNA-Spezies wird $m^1\text{A}$ in der GT ψ C-Schleife in Position 19 vom 3'OH-Ende der tRNA gefunden. Die phenylalanyl-spezifische tRNA aus Kaninchenleber enthält als bisher einzige sequenzierte tRNA $m^1\text{A}$ in der Dihydrouridinschleife (Keith et al. 1973). Von den tRNAs in *B. subtilis* enthält die tRNA^{Tyr} diese Base, jedoch müssen auf Grund der Menge von $m^1\text{A}$ in Gesamt-tRNA (0,3 Molprozent) auch andere spezifische tRNAs dieses modifizierte Nukleosid enthalten. Eine dieser tRNAs von *B. subtilis* scheint eine serin-spezifische tRNA zu sein. Interessant er-

scheint in diesem Zusammenhang die Frage, ob 1-Methyladenosin die gleiche Position wie in den meisten eukaryotischen tRNAs einnimmt. Wie in unserem Arbeitskreis in Zusammenarbeit mit einer anderen Arbeitsgruppe gefunden wurde, können tRNA^{Tyr} und tRNA^{Thr} aus Hefe, die beide bereits m¹A in Position 19 enthalten, mit *B. subtilis* Enzymextrakt in vitro methyliert werden. Dabei wird in beide tRNAs zusätzlich eine Methylgruppe in Stellung 1 eines Adenosinrestes in der Dihydrouridinschleife eingeführt (Raettig, Weissenbach, Dirheimer und Kersten 1976). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß m¹A in tRNAs von *B. subtilis* eine andere Position einnimmt als in allen bisher sequenzierten tRNAs aus Eukaryoten.

Die Base P ist ebenfalls nicht auf *B. subtilis* tRNA beschränkt. Sie kommt in allen untersuchten Bacillaceae mit etwa gleicher Häufigkeit vor. Da auch in der tRNA von *S. faecalis* und *B. stercorarius* ein methyliertes Nukleotid mit gleichen chromatografischen Eigenschaften wie Pp entdeckt wurde, scheint auch dieses modifizierte Nukleotid in allen grampositiven Bakterien vorzukommen. Das chromatografische Verhalten und die durchgeführten Markierungsexperimente sowie das UV-Spektrum der angereicherten Base sprechen dafür, daß P ein methyliertes Uracilderivat ist, das zusätzlich neben der Methylgruppe am Pyrimidin-Ringsystem eine polare Gruppe (bzw. Atom) enthält. Ein Schwefelatom kann auf Grund des durchgeführten Markierungsexperimentes ausgeschlossen werden. Nach Isolierung des Nukleosids (ca. 100 µg) konnte die Struktur mit Hilfe von NMR- und Massenspektrum in unserem Arbeitskreis aufgeklärt werden (Albani, Schmidt, Kersten, Geibel und Lüderwald 1976). Das Nukleosid P ist identisch mit 5-Methoxyuridin. Die modifizierte Base kommt in tRNA^{Val}, tRNA^{Ala} und tRNA^{Thr} in der 5'-Position ("wobble"-Position) des Anticodons vor (Murao und Ishikura 1976).

4.4. Modifizierung von tRNA und Differenzierung

Untersuchungen in unserem Arbeitskreis (Raettig, Dissertation 1976) haben ergeben, daß Auftreten und Verteilung von tRNA-Isoakzeptoren aus *B. subtilis* abhängig sind von den Bedingungen des Wachstums. So wurde eine untermodifizierte tRNA^{Phe} in Zellen gefunden, die bei ausreichender Sauerstoffversorgung gezüchtet wurden. Zugabe von Hemmstoffen der Proteinsynthese führte ebenfalls zu einer Anhäufung von untermodifizierter tRNA (Kersten et al. 1968, Waters et al. 1973, Huang und Mann 1974). In *E. coli* wurden im Argininmangel neue Isoakzeptoren für Phenylalanin gefunden (Schellberger, Dissertation 1974).

Veränderte Muster von tRNA-Isoakzeptoren traten nach Gabe von Carcinogenen und Hormonen, nach Virusinfektion, in Tumorzellen und in verschiedenen Differenzierungsstadien auf (Littauer und Inouye 1973). Sporen von *B. subtilis* weisen ein anderes Muster der tRNA-Isoakzeptoren auf als vegetative Zellen (Singhal und Vold 1976). Agris (1975) untersuchte die Zusammensetzung der tRNA während der Differenzierung von roten Blutkörperchen. Der Gehalt an Guanosin sank in differenzierten Zellen im Vergleich zu undifferenzierten Zellen ab. Zusätzlich änderte sich der Gehalt an modifizierten Nukleosiden wie Ribothymidin, Pseudouridin und ribose-methyliertem Guanosin. Rogg und Staehelin (1976) fanden in ausdifferenzierten Rattenhirnen eine serin-spezifische tRNA, die sich von den entsprechenden tRNAs in Rattenleber durch das Fehlen von Gm in der Dihydrouridin-Schleife unterschied.

Ein interessantes Objekt zum Studium von Differenzierungsvorgängen ist die Schmuckalge *Acetabularia mediterranea*. Bei der Reifung des Hutes wird ein Enzym des Nukleotidstoffwechsels, die Thymidinkinase, stimuliert (Bannwarth und Schweiger 1973). In diesen Zellen wurde die Zusammensetzung der tRNA von jungen Zellen ohne Hut und von Zellen nach Beginn der Hutreifung untersucht. Die entsprechenden Nukleinsäureextrakte stellte uns Herr Prof. Schweiger, Max-Planck-Institut für Zellbiologie, Wilhelmshaven, zur Verfügung.

Der Gehalt an modifizierten Nukleosiden in der tRNA von *A. mediterranea* ist in jungen Zellen (ohne Hut) und ausgereiften Zellen unterschiedlich. Ribothymidin und Dihydrouridin nehmen um das 4-5 fache zu. Auch der Gehalt an 1-Methyladenosin, 5-Methylcytosin und 1-Methylguanosin steigt nach Hutbildung an. Dagegen ist der Gehalt an Pseudouridin um die Hälfte vermindert (siehe Anlage). Mit Enzymen aus *E. coli* und SAM als Methylgruppendonor konnten 0,3 Mol Methylgruppen auf ein Mol tRNA aus jungen Zellen übertragen werden. Mit Enzymen aus Prokaryoten werden auf reife tRNAs aus Eukaryoten im allgemeinen keine Methylgruppen übertragen. Die Untersuchungen zeigen, daß die tRNA aus jungen Zellen von *A. mediterranea* unvollständig modifiziert ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode von Randerath et al. (1971, 1972) zur Analyse von Nukleosiden in tRNA und rRNA eingeführt. Diese Methode beruht auf der enzymatischen Spaltung von Ribonukleinsäuren mit nachfolgender Oxidation und Reduktion des Riboseanteils der Nukleoside. Die Nukleoside werden danach mit Tritium radioaktiv markiert und können durch zweidimensionale Dünnschichtchromatografie getrennt werden.

Die Analyse der Gesamt-tRNA von *B. subtilis* ergab, daß wie in *E. coli* tRNA der Gehalt an Ribothymidin ein Molprozent beträgt. Pseudouridin und Dihydrouridin machen in *B. subtilis* tRNA 1,5 bzw. 1,3 Molprozent aus. 7-Methylguanosin, 1-Methylguanosin und 6-Methyladenosin kommen in der tRNA von *B. subtilis* und *E. coli* in etwa gleichen Mengen vor.

In *B. subtilis* tRNA erfolgt die Biosynthese von Ribothymidin folat-abhängig, während alle anderen methylierten Nukleoside über S-Adenosylmethionin synthetisiert werden. Trimethoprim, ein Hemmstoff des Folsäure-Stoffwechsels, wurde benutzt zur Unterscheidung zwischen den beiden möglichen Biosynthesewegen des Ribothymidins (S-Adenosylmethionin- oder Tetrahydrofolsäure-abhängig) in tRNAs gramnegativer und grampositiver Bakterien. In Gegenwart von Trimethoprim wird ribothymidin-arme tRNA gebildet in grampositiven Micrococcaceae, *Streptococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis*, *Arthrobacter albidus* und allen untersuchten Bacillaceae mit Ausnahme von *Bacillus stearothermophilus*. Die isolierte ribothymidin-arme tRNA nimmt mit Enzymextrakten aus *E. coli* Methylgruppen von S-Adenosylmethionin auf. Rund 90 % der eingeführten Methylgruppen entfallen auf die CH₃-Gruppe von Ribothymidin. Damit ist gezeigt, daß die Modifikation von Uridin zu Ribothymidin in der tRNA der meisten grampositiven Bakterien mit einem Derivat der Tetrahydrofolsäure als Methylgruppendonor erfolgt. Trimethoprim hemmt nicht die Biosynthese von Ribothymidin in tRNAs gramnegativer Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae und *Rhizobium lupini*. Die spezifische tRNA-(Ura-

cil-5)Methyltransferase dieser gramnegativen Bakterien verwendet S-Adenosylmethionin als Coenzym.

Die methylierten Basen der ribosomalen RNA von *B. subtilis* wurden nach Markierung der Zellen mit $^{14}\text{CH}_3$ -Methionin analysiert und mit den methylierten Basen der rRNA von *E. coli* verglichen. Ribothymidin wird in der rRNA beider Mikroorganismen radioaktiv markiert. Damit ist gezeigt, daß die Biosynthese von Ribothymidin in der rRNA von *B. subtilis* S-Adenosylmethionin-abhängig erfolgt. Die 16S rRNA von *B. subtilis* enthält 8-9 Methylgruppen. Davon entfallen drei bis vier auf 6-Dimethyladenosin, zwei auf 2-Methylguanosin, ein bis zwei auf methylierte Cytidine und je eine Methylgruppe auf 7-Methylguanosin und 3-Methyluridin. Die 23S rRNA enthält 9-10 Methylgruppen. Pro Molekül kommen vier Ribothymidine und je zwei 2-Methylguanosine und 7-Methylguanosine vor. Die Nukleoside 5-Methylcytidin und 2-Methyladenosin treten in submolaren Verhältnissen auf. Sowohl in der 16S rRNA als auch in der 23S rRNA von *B. subtilis* wurde Pseudouridin nachgewiesen. In der 23S rRNA von *B. subtilis* fehlen 1-Methylguanosin und 6-Methyladenosin, die beide in der 23S rRNA von *E. coli* vorkommen. Mit Enzymextrakt aus *E. coli* und S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonor werden 1-Methylguanosin und 6-Methyladenosin in der rRNA von *B. subtilis* gebildet.

In tRNA grampositiver Bakterien kommen die methylierten Basen 1-Methyladenin und 5-Methoxyuracil ("P") vor. 1-Methyladenin macht in der Gesamt-tRNA von *B. subtilis* 0,3 Molprozent aus. In tRNA^{Tyr} von *B. subtilis* wurde ein 1-Methyladenosin pro Molekül gefunden. Die Base "P" kommt in verschiedenen Wachstumsphasen von *B. subtilis* in unterschiedlichen Mengen vor. Zwischen dem Auftreten von "P" und der Sporenbildung scheint kein Zusammenhang zu bestehen. Dagegen ist der Modifizierungsgrad der tRNA in verschiedenen Differenzierungsstadien von *Acetabularia mediterranea* unterschiedlich ausgeprägt.

LITERATURVERZEICHNIS

- Agris, P.F., H. Koh und D. Söll (1973)
Arch. Biochem. Biophys. 154, 277-282
- Agris, P.F. (1975)
Arch. Biochem. Biophys. 170, 114-123
- Agris, P.F., D.J. Armstrong, K.P. Schäfer und D. Söll (1975)
Nucleic Acid Res. 2, 691-698
- Albani, M. (1976)
Diplomarbeit Universität Erlangen-Nürnberg
- Albani, M., W. Schmidt, H. Kersten, K. Gebel und J. Lüderwald (1976)
FEBS Letters 70, 37-42
- Arnold, H.H. (1973)
Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- Arnold, H.H., und H. Kersten (1973)
FEBS Letters 36, 34-38
- Arnold, H.H., und H. Kersten (1975)
FEBS Letters 53, 258-261
- Arnold, H.H., W. Schmidt und H. Kersten (1975)
FEBS Letters 52, 62-65
- Arnold, H.H., W. Schmidt, R. Raettig, L. Sandig, H. Domdey und H. Kersten (1976)
Arch. Biochem. Biophys. 176, 12-20
- Attardi G., und F. Amaldi (1970)
in: E.E. Snell (Hrsgb.) Ann. Rev. Biochem. Vol. 39, Annual Reviews Inc., Palo Alto, S. 183-226
- Baguley, B.C., W. Wehrli und M. Staehelin (1970)
Biochemistry 9, 1645-1649
- Bannwarth, H., und H.G. Schweiger (1975)
Proc. R. Soc. Lond. B 188, 203-219
- Björk, G.R., und I. Svenson (1969)
Europ. J. Biochem. 9, 207-215
- Björk, G.R., und L.A. Isaksson (1970)
J. Mol. Biol. 51, 83-100
- Björk, G.R., und F.C. Neidhardt (1975)
J. Bacteriol. 124, 99-111

- Bock, R.M. (1967)
in: Methods of Enzymology, Vol. 12, Academic Press, New York,
S. 224
- Brownlee, G.D. (1972)
in: T.S. Work und E. Work (Hrsgb.), Determination of Sequences
in RNA, North-Holland Publishing Company und American Elsevier
Publishing Col. ICN, New York, S. 254
- Burchall, J.J., und G.M. Hitchings (1965)
Mol. Pharmacol. 1, 126-136
- Burton, R. (1968)
in: Methods of Enzymolgy, Vol 12B, Academic Press, New York,
S. 162-166
- Cimino, F., und F. Salvatore (1976)
Erwin Riesch Symposium "Modification of Nucleic Acids", Erlangen,
21.7.-24.7.1976, Abstract
- Chang, F.N. (1975)
Analyt. Biochem. 63, 371-379
- Clark, B.F.C., und K.A. Marcker (1966)
J. Mol. Biol. 17, 394-406
- Delk, A.S., und J.C. Rabinowitz (1974)
Nature 252, 106-109
- Delk, A.S., und J.C. Rabinowitz (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 528-530
- Doi, R.H. (1971)
in: J.A. Last und A.I. Laskin (Hrsgb.), Protein Biosynthesis in
Bacterial Systems, Marcel Dekker, New York, S. 68-88
- Domdey, H. (1974)
Zulassungsarbeit f. d. Lehrfach an Höheren Schulen, Universität
Erlangen-Nürnberg
- Dubin, D.T., und A. Günalp (1967)
Biochim. Biophys. Acta 134, 106-123
- Dubin, D.T. (1974)
J. Mol. Biol. 84, 257-273
- Egan, Z.B., und A.D. Kelmers (1972)
Prep. Biochem. 2, 265-274
- Ehresmann C., P. Stiegler, G.A. Mackie, R.A. Zimmermann,
J.P. Ebel und P. Fellner (1975)
Nucleic Acid Res. 2, 265-278

Eisenstadt, J., und P. Lengyel (1966)
Science 154, 524-527

Erdmann, V.A., M. Sprinzl und O. Pongs (1973)
Biochim. Biophys. Res. Comm. 54, 942-948

Fellner, P. (1969)
Eur. J. Biochem. 11, 12-27

Fischel, J.L., A. Krol, C. Ehresmann, P. Fellner und
J.P. Ebel (1975)
Biochimie 57, 885-897

Fleissner, E., und E. Borek (1962)
Proc. Natl. Acad. Sci. 48, 1199-1203

Fleissner, E., und E. Borek (1963)
Biochemistry 2, 1093-1100

Furuichi, Y., M. Morgan, S. Muthukrishnan und A.J. Shatkin (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 362-366

Gefter, M.L., und R.L. Russel (1969)
J. Mol. Biol. 39, 145-157

Hall, R.H. (1971)
The Modified Nucleosides in Nucleic Acids, Columbia University
Press, New York und London

Harvey, R.J. (1973)
J. Bacteriol. 114, 309-322

Hashimoto S., und M. Muramatsu (1975)
Biochemistry 14, 1956-1964

Helser, T.L., J.E. Davies und J.E. Dahlberg (1971)
Nature New Biol. 233, 12-14

Helser, T.L., J.E. Davies und J.E. Dahlberg (1972)
Nature New Biol. 235, 6-9

Huang, P.C., und M.B. Mann (1974)
Biochemistry 13, 4704-4710

Hurwitz, J., M. Gold und M. Anders (1964)
J. Biol. Chem. 239, 3462-3473

Johnson, L, H. Hayashi und D. Söll (1970)
Biochemistry 9, 2923-2831

- Kahle, P., P. Hoppe-Seyler und H. Kröger (1971)
Biochim. Biophys. Acta 240, 384-391
- Keith, G., F. Picaud, J. Weissenbach, J.P. Ebel, G. Petrissant
und G. Dirheimer (1973)
FEBS Letters 31, 345-347
- Keith, G., H. Rogg, G. Dirheimer, B. Menichi und T. Heyman (1976)
FEBS Letters 61, 120-123
- Kerr, S.J., und E. Borek (1973)
in: P.D. Boyer (Hrsgb.), The Enzymes, Vol. 9, Academic Press,
New York, S. 107-195
- Kersten H., P. Chandra, W. Tanck, W. Wiedemhöver und W. Ker-
sten (1968)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 659-663
- Kersten, H., und H. Linkemann (1969)
Zentralblatt f. Bakteriologie 212, 233-238
- Kersten, H., L. Sandig und H.H. Arnold (1975)
FEBS Letters 55, 57-60
- Klagsbrun, M. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 2612-2620
- Klootwijk, J., und R.J. Planta (1973)
Eur. J. Biochem. 39, 325-333
- Kuchino, Y., und S. Nishimura (1970)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 40, 306-313
- Lakings, B.D., und C.W. Gehrke (1971)
J. Chromatography 62, 347-367
- Littauer, U.Z., und H. Inouye (1973)
Ann. Rev. Biochem. 42, 439-470
- Littlefield, J.W., und D.B. Dunn (1958)
Biochem. J. 70, 642-651
- Loh, W. (1973)
Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall (1951)
J. Biol. Chem. 193, 265-275
- Maden, B.E.H., und M. Salim (1974)
J. Mol. Biol. 88, 133-164
- Mann, M.B., und P.C. Huang (1973)
Biochemistry 12, 5289-5294

Mans, R.L., und G.D. Novelli (1961)
Arch. Biochem. Biophys. 94, 48-53

Marcu, K., und B. Dudock (1975)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 62, 798-807

Markham, R., und J.D. Smith (1951)
Biochem. J. 52, 552-557

Munns, T.W., K.C. Podratz und P.A. Katzman (1974)
Biochemistry 13, 4409-4416

Nakada, D. (1965)
Biochim. Biophys. Acta 103, 455-465

Nau, F. (1976)
Biochimie 58, 629-645

Nishimura, S. (1972)
in: J.N. Davidson und W.E. Cohn (Hrsgb.), Progr. Nucleic Acid
Res. Mol. Biol., Vol. 12, Academic Press, New York und London,
S. 49-85

Ohnè, M., und B. Rutberg (1976)
J. Bacteriol. 125, 453-460

Ofengand, J., und C. Henes (1969)
J. Biol. Chem. 244, 6241-6253

Pearson, R.L., J.F. Weiß und A.D. Kelmers (1971)
Biochim. Biophys. Acta 228, 770-774

Perry, R.P., und D.E. Kelley (1974)
Cell 1, 37-42

Rader, J.I., und F.M. Huennekens (1973)
in: P.D. Boyer (Hrsgb.), The Enzymes, Vol. 9, Academic Press,
New York, S. 197-223

Raettig, R., W. Schmidt, G. Mahal, H. Kersten und H.H. Arnold (1976)
Biochim. Biophys. Acta 435, 109-118

Randerath, K. (1970)
Analyt. Biochem. 34, 188-205

Randerath, K., und E. Randerath (1971)
in: G.L. Cantoni und D.R. Davies (Hrsgb.), Procedures in Nucleic
Acid Res., Vol. 2, Harper und Row, New York, S. 796-812

Randerath, E., C.T. Yu und K. Randerath (1972)
Analyt. Biochem. 48, 172-198

Randerath, K., E. Randerath, L.S.Y. Chia und B.J. Nowak (1974)
Analyt. Biochem. 59, 263-271

- Randerath, E., L.S.Y. Chia, H.P. Morris und K. Randerath (1974)
Biochim. Biophys. Acta, 366, 159-167
- Schellberger, H. (1974)
Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- Schmidt, W. (1973)
Diplomarbeit Universität Erlangen-Nürnberg
- Schmidt, W., H.H. Arnold und H. Kersten (1975)
Nucleic Acid Res. 2, 1043-1051
- Schmidt, W., H.H. Arnold und H. Kersten (1976)
J. Bacteriol. (im Druck)
- Singer, C.E., G.R. Smith, R. Cortese und B.N. Ames (1972)
Nature New Biol. 238, 72-74
- Singh, H., und B.G. Lane (1964)
Can. J. Biochem. 42, 87-91
- Singhal, R.P., und B. Vold (1976)
Nucleic Acid Res. 3, 1249-1262
- Tamaoki, T., und B.G. Lane (1968)
Biochemistry 7, 3431-3440
- Tanaka, T., und B. Weisblum (1975)
J. Bacteriol. 123, 771-774
- Thammana, P., und W.A. Held (1974)
Nature 251, 682-686
- Traub, P., S. Mizushima, C.V. Lowry und M. Nomura (1971)
in: K. Moldave und L. Grossmann (Hrsgb.), Methods of Enzymology,
Vol. 20, Academic Press, New York, S. 391-407
- Watanabe, K., T. Oshima, M. Saneyoshi und S. Nishimura (1974)
FEBS Letters 43, 59-63
- Woese, C.R., G.E. Fox, L. Zablen, T. Uchida, L. Bohnen, K. Pechmann, B.J. Lewis und D. Stahl (1975)
Nature 254, 83-86
- Wyatt, G.R. (1951)
Biochem. J. 48, 581-584
- Yang, W.K., und G.D. Novelli (1968)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 31, 534-539
- Yang, S., E.R. Reinitz und M.L. Gefter (1973)
Arch. Biochem. Biophys. 157, 55-62

Zimmern, D. (1975)
Nucleic Acid Res. 2, 1189-1201

Zubay, G. (1962)
J. Mol. Biol. 4, 347-356

ANHANG

Zusammensetzung der tRNA von *Acetabularia mediterranea* vor und nach Hutbildung

Verbindung	Molprozent	
	vor Hutbildung	nach Hutbildung
G	27,1 $\pm$ 1,4	27,7 $\pm$ 1,6
C	23,2 $\pm$ 1,3	25,2 $\pm$ 1,8
A	22,6 $\pm$ 1,2	20,7 $\pm$ 1,8
U	24,5 $\pm$ 1,2	21,2 $\pm$ 1,9
m ⁷ G	fehlt	0,43 $\pm$ 0,06
Ψ	2,50 $\pm$ 0,20	1,42 $\pm$ 0,10
m ² G	fehlt	0,18 $\pm$ 0,02
m ¹ A	0,16 $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,05
m ⁵ C	0,20 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,03
m ¹ G	0,10 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,02
m ² G	fehlt	0,16 $\pm$ 0,03
hU	0,29 $\pm$ 0,05	1,32 $\pm$ 0,07
m ⁵ U	0,16 $\pm$ 0,02	0,84 $\pm$ 0,05
m ⁶ A a)	fehlt	0,24 $\pm$ 0,05

a) m⁶A kommt in tRNA von Eukaryoten nicht vor. Es entsteht aus m¹A durch Isomerisierung im alkalischen Milieu.

Frau Prof. Dr. H. Kersten danke ich herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit, die freundliche Unterstützung und die intensive Betreuung.

Herrn Prof. Dr. W. Kersten danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und die vielfältige Förderung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für zahlreiche Anregungen und hilfreiche Diskussionen.

Lebenslauf

Am 1.12.1947 wurde ich als zweites Kind der Eheleute Erich Schmidt und Anna Schmidt, geb. Löhner, in Schwarzenbach/Wald, Landkreis Hof/Saale, geboren.

Von 1954 bis 1960 besuchte ich die Volksschule in meiner Geburtsstadt. Im Herbst 1960 trat ich in die Staatliche Realschule Naila ein und legte dort 1964 die Mittlere Reife ab. Danach trat ich in das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Münchberg über. An dieser Schule legte ich im Juli 1967 das Abitur ab.

Von Oktober 1967 bis März 1969 leistete ich meinen Grundwehrdienst bei der 3. Kompanie des Panzerbataillons 123 in Gärnersdorf bei Amberg ab. Von August 1970 bis Oktober 1970 nahm ich an einem Lehrgang für Reserveoffiziersanwärter an der Kampftruppschule II in Munster/Niedersachsen teil.

Im Sommersemester 1969 begann ich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg mit dem Studium der Chemie und Biologie für das Lehramt an Realschulen. Im April 1972 legte ich die Fachliche Prüfung in Chemie und Biologie am Staatsinstitut in München-Pasing ab. Danach studierte ich weiter Biologie an der FAU Erlangen-Nürnberg und bestand im Oktober 1973 die Diplombiologen-Hauptprüfung.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Frau Prof. Dr. H. Kersten seit Oktober 1973 am Institut für Physiologische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg erstellt.

Am 31.7.1971 heiratete ich Fräulein Erika Ruckdäschel, Fachlehrerin für Handarbeit und Hauswirtschaft. Am 29.9.1975 wurde unser erstes Kind Alexander, am 20.9.1976 unser zweites Kind Wolfgang geboren.

Buchdruck - Offsetdruck

Karl Döres, 852 Erlangen, Jägerstr. 3 · Tel. 2 15 21